

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**INVESTIGAÇÕES SOBRE OFTALMOLOGIA DE ANIMAIS DE COMPANHIA
NÃO CONVENCIONAIS, COM ÊNFASE NA SOROPREVALÊNCIA DO
*Encephalitozoon cuniculi***

SUELEN BERGER BALDOTTO

CURITIBA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**INVESTIGAÇÕES SOBRE OFTALMOLOGIA DE ANIMAIS DE COMPANHIA
NÃO CONVENCIONAIS, COM ÊNFASE NA SOROPREVALÊNCIA DO
Encephalitozoon cuniculi.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Montiani- Ferreira

SUELEN BERGER BALDOTTO

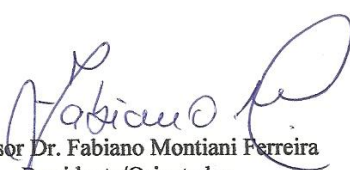
CURITIBA

2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**PARECER**

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “INVESTIGAÇÕES SOBRE OPTALMOLOGIA DE ANIMAIS DE COMPANHIA NÃO CONVENCIONAIS COM ÊNFASE NA SOROPREVALÊNCIA DO ENCEPHALITOOZON CUNICULI” apresentada pela Mestranda SUELEN BERGER BALDOTTO declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 27 de Março de 2012


Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Presidente/Orientador


Professora Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Membro


Professor Dr. José Ricardo Pachaly
Membro

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ilda e Pedro, que são o meu alicerce e apoio incondicional.

Ao meu irmão Henrique, pelo companheirismo, carinho e por fazer parte da
minha história.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu luz e força.

Ao meu orientador Dr Fabiano Montiani Ferreira, pela oportunidade, disponibilidade, conhecimentos e ensinamentos transmitidos; pelo incentivo, pela paciência e sua amizade durante todo período de residência e mestrado em que residi em Curitiba. Aprendi muito com você. O meu muito obrigada!

À Carolyn Cray, por realizar todas as sorologias referentes ao segundo capítulo da minha dissertação.

Ao professor Marcelo Machado, por toda a disposição, atenção e ajuda na descrição do crânio dos coelhos do terceiro capítulo da dissertação.

Ao grande Mestre Rogério R. Lange, pelo conhecimento inesgotável e amor com que transmite, por sua amizade, pelos empréstimos de livros para confecção deste trabalho, o seu bom humor e por tornar as atividades de pesquisa no Grupo muito mais agradáveis.

Ao seu João Boechat, à professora do Colégio agrícola de Presidente Prudente SP, Renilda Terezinha Monteiro, ao Professor Thiago Neves Batista e à professora Marlise Pompeo Claus do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense- Campus Araquari; a todos da equipe do Centro de triagem de animais Silvestres-Cetas, do Guira-Oga; do Zoológico Ribas Lange, Criadouro de Animais Silvestres e Hospital Veterinário da Itaipu, do Parque Ecológico Ouro Fino e do Vida Livre, pela ajuda e pela gentileza de ceder os animais para a pesquisa.

A todos os professores do mestrado, em especial a professora Rosângela, pela ajuda na aquisição dos kits para os exames de bioquímico.

Ao professor José Ricardo Pachaly e ao Professor Ivan Roque de Barros por aceitarem o convite para serem membros da banca examinadora e pelas valiosas sugestões e trabalho dedicado a avaliação do presente estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR e a CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos colegas Leandro Lima, Luciane Leigue, Andressa Tucholski e Letícia Olbertz pela ajuda e colaboração durante os experimentos e suas efetivas sugestões para a realização deste trabalho. Minha profunda gratidão.

À Ana Carolina Rodarte pela prontidão e ajuda em todas as etapas desta pesquisa. Obrigada pelo carinho e dedicação. Sem a sua ajuda este trabalho seria mais difícil.

Aos Mv residentes em Animais Selvagens, Rodolfo Bertoli, Alícia Hippólito, Camila Luba e André Tavares Somma pela ajuda no envio de amostras de seus pacientes ao laboratório para a realização deste trabalho.

Aos Mv residentes em Patologia Clínica, Bruno e Marília e ao mestrando Olair, pela ajuda na separação das amostras.

Ao meu namorado, Pablo C. Marchesin, pela paciência e por me proporcionar tantos momentos agradáveis e felizes.

Às minhas amigas mestradas Ana Laura D'Amico, Michelly Battisti, Raquel Cantarella pelo carinho, conversas e risadas. Guardarei vocês no lado esquerdo do peito.

Às birokas Fernanda Vigorito, Fernanda Ribeiro, Erika Fruhvald, Livia Schell, Camila Luba, Carol Rodarte, Marina Silva, Alícia Hippólito, Dani Manguera, RobertinhaSofiatti, e Débora Calado, pela companhia, pelo incentivo, pela amizade, por todos os momentos bons passados na nossa casa em Curitiba. Amo vocês!!!!

A todos os funcionários do Hospital Veterinário da UFPR, em especial, Maria, Meri, Regina, Carlão , Fernando , André e Marcinha por toda a ajuda, carinho e convivência .

E aqueles que sem querer eu esqueci,

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As presentes investigações buscaram trazer contribuições científicas para a oftalmologia de animais domésticos não-convencionais, além de estudos de revisão e soroprevalência do protozoário *Encephalitozoon cuniculi*. Para isso, os trabalhos foram subdivididos em quatro capítulos independentes entre si. No primeiro capítulo foi realizada revisão bibliográfica sobre o protozoário *Encephalitozoon cuniculi*, descrevendo sua morfologia, ciclo biológico, sinais clínicos, diagnóstico, diagnóstico diferencial, tratamento e profilaxia. O segundo capítulo trata-se de um estudo de soroprevalência do *Encephalitozoon cuniculi* em diferentes estados do Brasil. A soroprevalência do protozoário é ainda desconhecida no país, sendo este estudo de grande importância, uma vez que o protozoário pode acometer seres humanos. O terceiro e o quarto capítulos referem-se a estudos de parâmetros biométricos, morfológicos e de testes oftálmicos selecionados buscando padrões oculares normais em coelhos e gaviões carcarás. Estes estudos trazem uma descrição detalhada sobre anatomia oftálmica e estabelecimento de parâmetros para testes oftálmicos específicos como teste lacrimal de Schirmer, estesiometria, pressão intra-ocular, espessura central da córnea, comprimento da fenda palpebral, diâmetro de córnea bem como realização de estudo ecobiométrico do bulbo ocular e pesquisa da microbiota bacteriana conjuntival das duas espécies.

Palavras-chave: Coelhos, *E. cuniculi*, soroprevalência, zoonose, carcarás, bulbo ocular.

ABSTRACT

The present investigations sought to bring scientific contribution to ophthalmology for non-conventional livestock, and review studies and seroprevalence of the protozoan *Encephalitozoon cuniculi*. The studies were subdivided into four chapters independently. In the first chapter has a literature review off the protozoan *Encephalitozoon cuniculi*, describing its morphology, biological cycle, clinical signs, diagnosis, differential diagnosis, treatment and prophylaxis. The second chapter is a study of seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in different states of Brazil. The prevalence of the parasite is still unknown in the country, being this study of great importance since the parasite can affect humans. The third and fourth chapters refer to studies of biometric parameters, morphological tests and selected ophthalmic eye seeking patterns in normal rabbits and hawks. These studies present a detailed description of ophthalmic anatomy and establish parameters for specific tests as ophthalmic Schirmer tear test, esthesiometry, intraocular pressure, corneal thickness, length of eyelid closure, corneal diameter and conducting the study ecobiometrico ocular and conjunctival bacterial flora survey of the two species.

Keywords: Rabbits, *E. cuniculi*, seroprevalence, zoonosis, Falcon, eyeball.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Esporo de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 35 |
| Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 38 |
| Figura 3- A: Imagem de coelhos positivos para <i>E. cuniculi</i> , apresentando Síndrome Vestibular | 40 |
| Figura 4- Imagem de um coelho apresentando leve inclinação da cabeça: em decorrência da infecção pelo <i>E. cuniculi</i> | 41 |
| Figura 5 - A:Imagens de coelhos apresentando paralisia de membros pélvicos devido infecção por <i>E. cuniculi</i> | 41 |
| Figura 6- Imagens de olhos de coelhos apresentando sinais clínicos oftálmicos A- Catarata incipiente em cápsula anterior em bulbo ocular esquerdo B- Catarata madura em olho direito, com presença de sinéquia posterior 360° e resquíio de íris devido a uma sinéquia | 43 |
| Figura 7- Imagens de coelhos de diferentes raças apresentando sinais clínicos neurológicos causados pelo <i>Encephalitozoon cuniculi</i> A- Coelhos apresentando paralisia de membros pélvicos B- Coelhos apresentando sinais de síndrome vestibular, inclinação da cabeça (Torcicolo)..... | 84 |
| Figura 8 - Imagens de olhos de coelhos apresentando sinais clínicos oftálmicos A- Catarata incipiente na cápsula posterior no olho direito B- Catarata madura no olho direito, sinéquia posterior 360° com seclusão pupilar e uveíte. | 85 |
| Figura 9 - Imagens de olhos de coelhos apresentando sinais clínicos oftálmicos A- Pupila irregular em decorrência de uveíte reflexa, causada por úlcera de córnea mecânica por abrasão da córnea no chão devido à inclinação da cabeça B- Luxação posterior do cristalino causado por glaucoma associado à uveíte..... | 85 |
| Figura 10 - Imagens de sinais clínicos oftálmicos em olhos de coelhos A- Bulbo ocular esquerdo bulftálmico, com midríase parcial caracterizando quadro de glaucoma associado à uveíte B- Hifema em câmara anterior do bulbo ocular direito e buftalmia em um coelho positivo para <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 86 |
| Figura 11 - Imagem de estrabismo em olho de coelho infectado pelo <i>E. cuniculi</i> | 86 |

Figura 12-Sequência fotográfica de parte dos testes oculares realizados nos coelhos. A: Teste lacrimal de Schirmer; B: Coleta de amostra de conjuntiva e margem palpebral; C: Análise estesiométrica da córnea central; D: Mensuração da PIO; E: Paquimetria da córnea; F: Mensuração do diâmetro da rima palpebral;..... 108

Figura 13-Elementos ósseos da órbita de coelho doméstico adulto e macho. A) Aspecto dorsal do esqueleto da cabeça, sem mandíbula; B) Aspecto lateral do esqueleto da cabeça, com mandíbula; C) Aspecto caudolateral da parede rostral da órbita; D) Aspecto rostrodorso da órbita óssea, evidenciando as paredes medial e ventral. Legenda: ap, asa do osso pré-esfenoide; B, osso basisfenoide; co, canal óptico; cp, crista pterigoidea; F, osso frontal; fa, forames alares; fe, forame etmoidal; fes, forame espinhoso; fl, forame lacrimal; fo, fissura orbital (★ indica o corpo do osso esfenoide); isc, incisura supraorbital caudal; isr, incisura supraorbital rostral; L, osso lacrimal; lpp, lâmina perpendicular do palatino; pc, processo coronoide da mandíbula; pl, processo lacrimal; pzm, processo zigomático do maxilar; pzt, processo zigomático do temporal; ta, tubérculo alveolar do maxilar (★ indica o alvéolo do 1º dente molar superior); tf, túber facial; Z, osso zigomático. Barras: 1cm. 117

Figura 14 - Imagem da terceira pálpebra do olho esquerdo de diferentes coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). A e B: Presença de pigmentação na borda da terceira pálpebra, com pontos circulares elevados no epitélio da conjuntiva na face palpebral. C e D: Presença da mesma estrutura, porém sem a presença de pigmentação, por se tratar de um coelho albino..... 119

Figura 15 - Imagem de olhos de coelhos. A e B: Observe o seio venoso próximo aos músculos extraocular, reto dorsal, e da região do limbo. 120

Figura 16 - Imagem de olhos de coelhos com diferentes cores de Iris e presença de finos cílios em pálpebra superior e inferior. Observe, também uma leve rotação da margem palpebral superior em direção a superfície ocular, entretanto não chegando a ser um entrópio palpebral e a presença de uma leve pigmentação na margem palpebral de coelhos da raça chinchila(Figura A, C e D). 121

Figura 17 - Imagem da íris, observe que ela é levemente abaulada em sua margem pupilar, voltada para câmara anterior, não sendo possível visualizar o epitélio pigmentar da íris, lembrando um entrópio uveal. 121

Figura 18 - Comparação entre pupilas de cor marrom e pupilas pouco pigmentadas tanto em miose quanto em midríase farmacológica. A: Coelho representante de íris marrom escura. Observe que este formato da pupila tende

a ser mais oval durante a miose. B: Coelho com íris marrom escura responderam pobremente e mais lentamente à dilatação farmacológica do que às com íris de coloração clara. C: Neste coelho com íris de coloração clara, observou uma miose maior quando comparada ao coelho de íris castanho-escuro. D: Coelhos com a íris pouco pigmentada responderam melhor à dilatação farmacológica. Observe que a pupila sob midríase em animais com íris pouco pigmentadas apresentaram dilatação completa quando comparada aos coelhos de íris escura..... 123

Figura 19 - Ultrassonografia ocular em modo-B após posicionamento ideal. Os quatro principais pontos de referência (córnea, face anterior da lente, face posterior da lente, superfície da retina) ao longo do eixo axial do bulbo ocular são todos perpendiculares. Nesta imagem representativa, observam-se quatro linhas tracejadas que foram colocadas sobre a imagem capturada pelo sistema ultrassônico: 1) comprimento axial do bulbo ocular; 2) profundidade da câmara anterior; 3) comprimento da lente; 4) profundidade da câmara vítrea. 128

Figura 20 - Sequência fotográfica de parte dos testes oculares realizados nos carcarás. A: Teste lacrimal de Schirmer; B: Coleta de amostra de conjuntiva; C: Análise estesiométrica da córnea central; D: Mensuração da PIO..... 151

Figura 21 - Sequência fotográfica de parte dos testes oculares realizados nos carcarás. A: Paquimetria de córnea; B: Ultrassom ocular; C: Mensuração do diâmetro da rima palpebral; D: Mensuração do diâmetro da córnea. 154

Figura 22 - Fotografia do olho esquerdo de um carcará. Observe as margens palpebrais com uma leve pigmentação e a presença de filoplumas (cílios modificados), espessos e longos na pálpebra superior, e na inferior, cílios mais delgados, curtos e em menor quantidade que na pálpebra superior..... 157

Figura 23 - Imagem da terceira pálpebra. Observe que a terceira pálpebra apresenta relativa transparência e presença de inúmeros vasos, podendo assim, visualizar a íris do paciente..... 158

Figura 24 - Imagem da terceira pálpebra. Observe que a terceira pálpebra é bem desenvolvida e móvel, localizada no canto nasal do bulbo ocular, movendo-se em direção nasotemporal. 159

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Porcentagem das raças de coelhos estudadas..... | 82 |
| Tabela 2- Porcentagem das cores das pelagens dos coelhos submetidos a avaliação sorológica..... | 82 |
| Tabela 3-Porcentagem das raças de coelhos estudadas..... | 101 |
| Tabela 4-Resultados obtidos para os testes de diagnóstico oftalmológicos e achados ecobiométricos o olho de coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>). | 110 |
| Tabela 5-Resultados estatísticos (média e desvio padrão) da raça Rex Amarelo comparativamente a diferentes raças estudadas nesta pesquisa, que apresentaram significância para o TLS, pressão intra-ocular e estésimetria pelo teste T de Student ($P<0,05$).- | 111 |
| Tabela 6-Resultados estatísticos (média e desvio padrão) da raça Rex Borboleta e Lion comparativamente a diferentes raças avaliadas, que apresentaram significância para o TLS, pressão intra-ocular e estésimetria pelo teste T de Student ($P<0,05$)..... | 111 |
| Tabela 7 - Frequência de bactérias aeróbias isoladas de superfície ocular de 92 olhos de coelhos, aparentemente saudáveis. | 125 |
| Tabela 8-Resultados obtidos para os testes de diagnóstico oftalmológicos e achados ecobiométricos do olho de carcarás (<i>Caracara plancus</i>). | 156 |
| Tabela 9 - Frequência de bactérias isoladas nos olhos dos carcarás. | 160 |

LISTA DE ABREVIATURA

E.cuniculi- *Encephalitozoon cuniculi*

Elisa - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

AIDS- Síndrome da imunodeficiência adquirida

µm - micrometro

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

DNA- Ácido desoxirribonucleico

LCR- Líquido Cefalorraquidiano

AFT- Acid Fast Tricrome

PCR- Reacção em Cadeia da Polimerase

mg – miligramas

Kg – quilograma

SC- Subcutâneo

IV- intravenoso

IRC- Insuficiência Renal Crônica

°C – Celsius

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

TLS – teste lacrimal de *Schirmer*

PÍO – pressão intra-ocular

mL – Mililitro

ALT- alanino aminotransferase

GGT- Gama glutamil transpeptidase

FA- Fosfatase Alcalina

EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid(anticoagulante)

$\mu\text{g/ML}$ - *Micrograma por mililitro*

PBS- Tampão fosfato-salino

$\mu\text{/L}$ - *Micrograma por litro*

nm- Nanômetro

ECC – espessura central da córnea

mm – Milímetro

cm – centímetros

mmHg – milímetros de mercúrio

BHI – *brain-heart infusion*

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo

SRD – sem raça definida

g – grama

min – minuto

SCP – *Staphylococcus* coagulase positivo

BGNF – Bacilo Gram-negativo não fermentador

SUMÁRIO

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO GERAL | 21 |
| 2. | OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 21 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS: | 22 |
| 3. | CAPITULO 1 - O <i>Encephalitozoon cuniculi</i> -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 23 |
| 3.1 | RESUMO..... | 23 |
| 3.2 | ABSTRACT | 23 |
| 3.3 | INTRODUÇÃO | 24 |
| 3.4 | REVISÃO DE LITERATURA | 26 |
| 3.4.1 | Filo Microsporídio | 26 |
| 3.4.1.1 | <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 30 |
| 3.4.2 | Morfologia..... | 34 |
| 3.4.3 | Ciclo Biológico | 35 |
| 3.4.4 | Sinais Clínicos | 38 |
| 3.4.4.1 | Sinais Neurológicos..... | 39 |
| 3.4.4.2 | Sinais Clínicos Renais..... | 42 |
| 3.4.4.3 | Sinais clínicos oculares | 42 |
| 3.4.5 | Diagnóstico..... | 44 |
| 3.4.6 | Diagnósticos Laboratoriais | 45 |
| 3.4.6.1 | Sorologia | 45 |
| 3.4.6.2 | Microscopia óptica..... | 47 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.4.6.3 | Microscopia Eletrônica | 48 |
| 3.4.6.4 | Métodos Moleculares (PCR)..... | 48 |
| 3.4.6.5 | Exame pós morte e histopatologia. | 48 |
| 3.4.7 | Diagnóstico Diferencial | 50 |
| 3.4.8 | Tratamento | 52 |
| 3.4.9 | Profilaxia..... | 54 |
| 3.5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 56 |
| 3.6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
| 4. | CAPÍTULO 2 - SOROPREVALÊNCIA DO <i>Encephalitozoon cuniculi</i> , EM COELHOS NO BRASIL | 72 |
| 4.1 | RESUMO..... | 72 |
| 4.2 | ABSTRACT | 73 |
| 4.3 | INTRODUÇÃO | 74 |
| 4.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 77 |
| 4.5 | RESULTADOS | 80 |
| 4.6 | DISCUSSÃO | 87 |
| 4.7 | CONCLUSÕES | 91 |
| 4.8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 92 |
| 5. | CAPÍTULO 3 - O OLHO DO COELHO (<i>Oryctolagus cuniculus</i>): OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS, ACHADOS ECOBIOMÉTRICOS E VALORES DE REFERÊNCIA PARA TESTES SELECIONADOS DE DIAGNÓSTICO OFTÁLMICO. | 95 |
| 5.1 | RESUMO | 95 |
| 5.2 | ABSTRACT | 96 |
| 5.3 | INTRODUÇÃO..... | 98 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 5.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 99 |
| 5.4.1 | Preparo das peças | 99 |
| 5.4.2 | Procedimentos oftálmicos em animais vivos | 101 |
| 5.4.3 | Exames oftálmicos | 102 |
| 5.4.1.1 | Inspeção ocular | 103 |
| 5.4.1.2 | Teste lacrimal de Schirmer (TLS I) | 103 |
| 5.4.1.3 | Análise microbiológica..... | 104 |
| 5.4.1.4 | Estesiometria..... | 105 |
| 5.4.1.5 | Pressão intra-ocular (PIO)..... | 105 |
| 5.4.1.6 | Paquimetria central de córnea..... | 106 |
| 5.4.1.7 | Biometria ultrassonográfica em modo-B..... | 106 |
| 5.4.1.8 | Diâmetro da fenda palpebral e diâmetro de córnea..... | 107 |
| 5.4.1.1 | Dilatação pupilar | 109 |
| 5.5 | Análise estatística | 109 |
| 5.6 | RESULTADOS..... | 110 |
| 5.6.1 | Anatomia da órbita | 112 |
| 5.6.2 | Observações gerais nos animais vivos | 116 |
| 5.6.3 | Observações da morfologia ocular externa em animais vivos..... | 118 |
| 5.6.4 | Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)..... | 123 |
| 5.6.5 | Análise microbiológica..... | 124 |
| 5.6.6 | Estesiometria da córnea..... | 125 |
| 5.6.7 | Pressão intra-ocular (PIO)..... | 126 |
| 5.6.8 | Espessura corneana central | 126 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.6.9 | Biometria ultrassonográfica de modo –B..... | 127 |
| 5.6.10 | Diâmetro de Fenda Palpebral e Diâmetro de Córnea..... | 128 |
| 5.7 | DISCUSSÃO | 129 |
| 5.8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 136 |
| 6. | Capítulo 4 - O OLHO DO CARCARÁ (<i>Caracara plancus</i>): OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS, ACHADOS ECOBIOMÉTRICOS E VALORES DE REFERÊNCIA PARA TESTES SELECIONADOS DE DIAGNÓSTICO OFTÁLMICO | 142 |
| 6.1 | RESUMO..... | 142 |
| 6.2 | ABSTRACT | 143 |
| 6.3 | INTRODUÇÃO | 144 |
| 6.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 145 |
| 6.3.1 | Exames oftálmicos | 147 |
| 6.3.2 | Inspeção Ocular | 148 |
| 6.3.3 | Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)..... | 148 |
| 6.3.4 | Análise microbiológica..... | 149 |
| 6.3.5 | Estesiometria..... | 150 |
| 6.3.6 | Pressão intra-ocular (PIO)..... | 150 |
| 6.3.7 | Paquimetria central de córnea..... | 152 |
| 6.3.8 | Biometria ultrassonográfica em modo-B..... | 152 |
| 6.3.9 | Diâmetro da fenda palpebral e diâmetro de córnea..... | 153 |
| 6.5 | Análise estatística..... | 154 |
| 6.6 | RESULTADOS | 155 |
| 6.5.1 | Observações gerais nos animais vivos | 155 |
| 6.5.2 | Observações da morfologia ocular externa em animais vivos..... | 156 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6.5.3 | Teste lacrimal de Schirmer (TLS) | 158 |
| 6.5.4 | Análise Microbiológica..... | 159 |
| 6.5.5 | Estesiometria da córnea | 161 |
| 6.5.6 | Pressão intra-ocular (PIO)..... | 161 |
| 6.5.7 | Espessura central da córnea | 161 |
| 6.5.8 | Biometria ultrassonográfica de modo –B..... | 162 |
| 6.5.9 | Diâmetro de Fenda Palpebral e Diâmetro de Córnea..... | 163 |
| 6.1 | DISCUSSÃO | 163 |
| 6.2 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 169 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

O agente *Encephalitozoon cuniculi* é um parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Microsporidia, do reino Fungi, que afecta um amplo leque de animais, incluindo os seres humanos. No coelho, a infecção pode ocorrer pelas vias oral, nasal e, menos frequentemente, transplacentária, sendo que o microrganismo multiplica-se principalmente no cérebro e nos rins. A infecção pode ser assintomática, mas também pode originar sinais clínicos neurológicos, renais e oculares, ou ainda podendo causar morte súbita. Sendo um agente com potencial zoonótico, o *E. cuniculi* tem importância em termos de saúde pública pois pode também infectar seres humanos, principalmente imunodeprimidos. O coelho é o principal hospedeiro desta doença que pode apresentar sinais clínicos oftálmicos importantes como uveíte, catarata, ceratite e glaucoma. Uma vez que o coelho é considerado como animal de estimação não convencional, ainda encontra-se em construção a base de conhecimentos sobre o seu órgão da visão, sendo de grande importância o conhecimento de parâmetros normais para testes oftálmicos nesta espécie. Conhecendo precisamente todos os parâmetros normais, o oftalmologista veterinário poderá identificar no futuro a presença de alterações oculares mais sutis. Sabendo-se que o protozoário acomete uma variedade de espécies, incluindo aves, houve o interesse também em estudar parâmetros normais oftálmicos de outra espécie selvagem abundante no Brasil, mas ainda pouco estudada no ponto de vista oftálmico, sendo a espécie estudada o carcará.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta dissertação foi determinar a soroprevalência do *Encephalitozoon cuniculi* em coelhos em alguns estados do Brasil, apresentando ou não doenças neurológicas ou oftálmicas, assim como fazer uma revisão de literatura do *E. cuniculi* descrevendo sua morfologia, ciclo biológico, sinais clínicos, diagnóstico, tratamento e profilaxia, por fim,

descrever a anatomia oftálmica de coelhos e carcarás , bem como estabelecer parâmetros de referência para testes oftálmicos clínicos específicos para estas duas espécies.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Quantificar os casos soropositivos para *Encephalitozoon cuniculi* com sinais clínicos oftálmicos e neurológicos, bem como propor protocolos de diagnóstico e tratamento adequados para estes casos;
- Pesquisar a soroprevalência em coelhos no Brasil (nos estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro), bem como determinar sua significância em relação sexo, idade, raça cor e região estudada;
- Por meio da revisão bibliográfica, descrever o protozoário *Encephalitozon cuniculi*, sua morfologia, ciclo biológico, sinais clínicos, diagnóstico, diagnóstico diferencial, tratamento e profilaxia;
- Realizar estudo morfológico do bulbo ocular e órbita óssea do coelho;
- Estabelecer valores de referência para testes lacrimal de Schirmer, pressão intra-ocular e estesiometria de córnea e espessura da córnea central em coelhos e carcarás;
- Determinar a microbiota bacteriana ocular normal de coelhos e carcarás;
- Mensurar, empregando técnicas de ultrassonografia, a profundidade da câmara anterior, diâmetro da lente, profundidade da câmara vítrea e diâmetro do bulbo ocular (eixo axial); bem como mensurar diâmetro da fenda palpebral e o diâmetro de córnea em coelhos e carcarás.

3. CAPITULO 1 - O *Encephalitozoon cuniculi*-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESUMO

O agente *Encephalitozoon cuniculi* é um parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Microsporidia. Trata-se do organismo responsável pela encefalitozoonose, uma zoonose que acomete principalmente os coelhos, podendo também afetar outras espécies de animais. No coelho, a infecção pode ocorrer pelas vias oral, respiratória ou transplacentária, com menos frequência. O micro-organismo multiplica-se principalmente no cérebro e nos rins. A infecção pode ser assintomática ou originar sinais clínicos neurológicos, renais ou oculares, ou mesmo morte súbita. O diagnóstico presuntivo é obtido pela sorologia e o definitivo pela histopatologia.

A presente revisão tem por objetivo elucidar as questões pertinentes à Encefalitozoonose e seu agente *Encephalitozoon cuniculi*, avaliar os principais fatores de risco de infecção nas pessoas e animais, o ciclo biológico do agente, transmissão, apresentação clínica, tratamento e profilaxia na tentativa de evitar a infecção e perpetuação do agente.

Palavras-chave: *E.cuniculi*, microsporídeo, Encefalitozoonose, anticorpos, protozoário, coelho, diagnóstico

3.2 ABSTRACT

The agent *Encephalitozoon cuniculi* is an obligate intracellular parasite, belonging to the phylum Microsporidia. This is the organism responsible for encephalitozoonosis, a zoonosis that primarily affects the rabbits, but can also affect other species of animals. In rabbits, the infection can occur through skin contact, inhalation or placenta, less often. The micro-organism multiplies primarily in the brain and kidneys. The infection can be asymptomatic or cause clinical signs in neurological system, renal or ophthalmic, or even sudden death.

The presumptive diagnosis is obtained by serology and final diagnosis by histopathology.

This review aims to clarify the relevant issues Encephalitozoonosis and its agent, *Encephalitozoon cuniculi*, to evaluate the main risk factors for infection in humans and animals, the life cycle of the agent, transmission, clinical presentation, treatment and prophylaxis in Attempt to avoid infection and perpetuation of the agent.

Keywords: *E.cuniculi*, microsporidia, encephalitozoonosis, antibodies, protozoan, rabbit, diagnosis.

3.3 INTRODUÇÃO

O *Encephalitozoon cuniculi* é um protozoário intracelular obrigatório, oportunista, pertencente à classe Microsporea^{1, 2}. Trata-se do organismo responsável pela encefalitozoonose, uma zoonose que acomete principalmente os coelhos, mas também descrita num vasto leque de animais, como por exemplo, pássaros³, roedores, raposas, macacos, gatos, cães, ovinos, caprinos suínos e em seres humanos^{4, 5, 6}.

Em seres humanos, pensa-se que a pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) permitiu que estes organismos se multiplicassem, apesar de já existirem infecções assintomáticas em indivíduos imunocompetentes, existindo poucos casos referidos em humanos até em 1985^{7, 8}.

O hospedeiro pode eliminar esporos na urina. Suspeita-se que a principal via de infecção do *E. cuniculi* ocorra pela ingestão de água e comida contaminadas por esporos. Podendo também ocorrer infecção transplacentária e inalatória⁹. Esporos são relativamente resistentes e podem sobreviver por pelo menos quatro semanas em temperatura ambiente¹⁰.

Nos coelhos, a doença se expressa de forma assintomática ou pode apresentar sinais clínicos típicos de lesão do sistema nervoso, como síndrome vestibular e paresia de membros pélvicos. A inclinação de cabeça (*head tilt*) apresenta-se como principal sinal neurológico nesses casos ^{11, 9}. A doença ainda pode causar problemas renais. O bulbo ocular é particularmente afetado por este agente, causando tipicamente uveíte, glaucoma secundário e catarata ^{11, 9}.

Em seres humanos, a encefalitozoonose é uma doença de caráter emergente ¹² e é responsável por diferentes distúrbios clínicos como diarreia, sinusite, pneumonia, miosite, lesão cerebral, ceratite e infecções sistêmicas, sendo que os aspectos patogênicos da doença variam principalmente de acordo com a competência imunológica do hospedeiro ^{13, 12}.

O diagnóstico presuntivo é baseado nos sinais clínicos associado ao exame sorológico, sendo o último realizado por meio da titulação de anticorpos séricos pelo método ELISA indireto, imunofluorescência indireta ¹¹ ou pelo teste de soroaglutinação direta ¹⁴.

O diagnóstico definitivo *antemortem* pode ser comprometido pela dificuldade em isolar o agente transmissor da doença, sendo o exame histopatológico necessário para detecção e isolamento do mesmo, pois a sorologia apenas confirma o contato com o agente, mas não dá o diagnóstico definitivo da doença. Já no *posmortem*, o exame histopatológico pode evidenciar o agente geralmente com áreas granulomatosas no rim, no bulbo ocular e no cérebro ¹¹.

O tratamento visa reduzir a inflamação e evitar a formação de esporos. Uma vez instalados os sinais neurológicos, é improvável haver cura completa ¹⁵.

A profilaxia tem como objetivo manter altos os padrões de higiene no plantel. Sendo assim, devem ser implementadas medidas de controle sanitárias eficazes, como limpeza das gaiolas com a maior frequência possível e evitando-se o contacto da urina com a água e comida ^{9,16}. Porém, a eliminação

de coelhos soropositivos continua a ser o melhor método de prevenção e disseminação do agente¹⁵. Com relação aos coelhos de estimação, deve-se ter um cuidado especial, uma vez que apresentam um alto potencial zoonótico¹⁷.

Dessa forma, o presente trabalho busca elucidar as questões pertinentes à Encefalitozoonose e seu agente *Encephalitozoon cuniculi*, enfocando o ciclo biológico, os sinais clínicos da enfermidade, o diagnóstico, o tratamento, e principalmente, os fatores de risco que podem levar tanto pessoas quanto animais a entrarem em contato com o agente. Além disso, apresentar os principais métodos profiláticos na tentativa de evitar a infecção e a perpetuação do agente.

3.4 REVISÃO DE LITERATURA

3.4.1 Filo Microsporídio

Os microsporídios são um grupo extremamente diversificado de organismos, compreendendo mais de 1.200 espécies que parasitam uma grande variedade de hospedeiros invertebrados e vertebrados¹⁸.

O primeiro microsporídio foi descrito em meados do séc. XIX quando a “pébrine” (pimenta – preta) devastou os bichos-da-seda na Europa do sul e ameaçou destruir a indústria da seda europeia. O parasita foi classificado por Nägeli, em 1857, como *Nosema bombycis* e incluído no grupo dos fungos esquizomicetas^{19, 20}. Também foi estudado por Pasteur, a fim de ajudar a aliviar o desastre econômico na indústria da seda²¹.

A primeira infecção por Microsporídio em mamíferos foi relatada 1922, por Wright e Craighead, que identificou no cérebro, coluna e rins de um coelho paralisado uma nova espécie (*Nosema cuniculi*) um micro-organismo, causador de paralisia motora infecciosa em coelhos de laboratório²¹. Então, em 1923, Levatidi et al. classificaram-no com o nome de *Encephalitozoon cuniculi*²².

Em seres humanos, o primeiro caso de microsporidiose foi registrado por Magarinos Torres em 1927, mas sua importância aumentou apenas nas últimas décadas, em consequência de sua detecção mais freqüente em populações suscetivelmente saudáveis, assim como na sua manifestação em pessoas acometidas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ²³. Antes da descoberta da AIDS, apenas oito casos de infecção em seres humanos por microsporídios haviam sido relatados. Na maioria dos casos, a identificação de espécies do agente causador não foi conclusiva. Somente, em 1985, dois anos após a identificação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) como o agente causador da AIDS, é que foi descoberto que o agente causador da infecção em pacientes infectados pelo HIV com diarreia crônica era a espécie *Enterocytozoon bieneusi* ²⁴. Posteriormente, vários novos gêneros e espécies de microsporídios foram encontrados, sendo importantes patógenos oportunistas em seres humanos, infectando praticamente todos os órgãos do corpo em amplos tipos de células ²⁵.

Com um trabalho de conscientização e melhores métodos de diagnóstico, as infecções por microsporídeos têm sido reconhecidas em um número amplo da população humana, incluindo transplantados, viajantes, crianças, usuários de lentes de contato e idosos ^{26, 27}. Além disso, espécies de microsporídios que infectam os seres humanos foram identificados em animais e fontes de água, levantando preocupações de saúde pública sobre a transmissão zoonótica, fluvial e marítima de microsporídios ^{28, 27}.

O filo Microsporidio é constituído por micro-organismos complexos e altamente especializados ^{29, 20}. A taxonomia desses organismos foi baseada principalmente em seu ciclo de vida e nas características ultraestruturais, incluindo o tamanho, o desenvolvimento, a maturidade dos organismos, o arranjo nuclear, o número e alinhamento do espiralado helicoidal do filamento polar, a localização intracelular de desenvolvimento e o modo de divisão nuclear e celular ^{30, 31}.

Até há pouco tempo considerou-se que os microsporídios eram protozoários ^{29, 20}, mas actualmente pensa-se que evoluíram a partir dos

fungos, sendo mais próximos dos zigomicetas ^{32, 33}. Existem evidências genéticas e moleculares que sugerem uma relação filogenética mais estreita com fungos, pois possuem em sua estrutura proteína de choque térmico mitocondrial, alfa e beta tubulinas, quitina e trealose, que são componentes que assemelham-se as do fungo ³⁴.

Esses organismos desenvolveram um mecanismo de infecção extremamente sofisticado a parte de outras adaptações ao parasitismo intracelular, que resultaram de uma evolução reductiva. Quando comparados com outros seres eucariotas, os Microsporídios são reduzidos a vários níveis morfológicos, bioquímicos, metabólicos entre outros ¹⁹. Mesmo a nível molecular estes organismos apresentam os menores genomas eucariotas descritos até hoje, que evoluíram a partir de outros mais extensos, por perda e compactação ^{18, 14}.

Estudos moleculares indicam que, embora as estimativas de tamanhos de genoma sugerem uma ampla variação entre diferentes espécies de microsporídios, o genoma do microsporídio é de tamanho relativamente pequeno para os padrões de uma célula eucariótica. O *E. cuniculi* possui um genoma haplóide de apenas 2,9 mega pares de base (Mb), seguidos de 11 cromossomos ^{35, 36}.

Os microsporídios são conhecidos por serem agentes causadores de doenças economicamente importantes em insetos (bicho-da-seda e abelhas produtoras de mel) ³⁷, peixes ^{38, 39} e mamíferos ⁴⁰.

Existem cinco espécies do gênero *Encephalitozoon*: o *Encephalitozoon cuniculi*, o *E. hellem*, o *E. intestinalis*, o *E. bieneusi* e o *E. lacertae*, sendo as quatro primeiras parasitas oportunistas em seres humanos com HIV ⁹. As infecções mais comuns em seres humanos por microsporídios são causadas pelo *E. intestinalis* e *E. bieneusi*. Ambas as espécies foram encontradas em todo o mundo, principalmente em pacientes infectados pelo vírus HIV, em pessoas com diarreia crônica imunocompetentes com diarreia aguda auto limitante. O *Encephalitozoon cuniculi* e o *Encephalitozoon hellem*

foram diagnosticados, em raras exceções, em pacientes imunocomprometidos, causando infecções locais ou disseminadas. Outras raras espécies de microsporídios infectando pacientes imunodeficientes incluem *Vittaforma córneas*, *Pleistophora ronneafiei*, *Trachipleistophora* spp. e *Brachiola* spp. Além disso, *V. córneas*, *Trachipleistophora hominis*, *Brachiola algerae*, *Nosema ocularum*, *Microsporidium ceylonensis* e *Microsporidium africanum* têm sido descritos em casos isolados como agentes de infecções oculares em pessoas imunocompetentes¹⁸. É de especial interesse o fato de que os parentes mais próximos das duas espécies que infectam os seres humanos, pertencentes aos gêneros, *Trachipleistophora* e *Vittaforma* são microsporídios que infectam insetos, especulando assim, que os insetos podem servir como reservatórios para estes microsporídios. De fato, outro microsporídio de origem artrópode, *Brachiola algerae*, demonstrou ser um agente causador de infecções em seres humanos⁴¹.

Estudos moleculares identificaram variabilidade genética e fenotípica dentro dessas espécies, indicando que não são uniformes. Enquanto que a importância desta variabilidade permanece em grande parte desconhecida para o *E. intestinalis* e o *E. hellem*; variações de cepas de *E. cuniculi* e *E. bienersi* fornecem novas percepções sobre a biologia, origem e distribuição destes parasitas permitindo que sejam abordados questões sobre o seu potencial zoonótico¹⁸.

A infecção por *E. cuniculi* e *E. hellem* em seres humanos imunodeprimidos causa sintomatologia que inclui sinusite, cerato-conjuntivite, encefalite, traqueobronquite, nefrite intersticial, hepatite ou miosite^{22; 9}. Os esporos destas duas espécies são morfologicamente indistinguíveis¹⁸. Os coelhos acometidos pelo *Encephalitozoon* mostram uma variedade de sinais clínicos, desde assintomática até a morte súbita. A doença pode ser aguda ou crônica, e os sinais clínicos são causados por lesões no sistema nervoso central, rim ou olho⁴².

A infecção por *E. cuniculi* já foi descrita em um grande número de mamíferos, como em coelhos, camundongos, ratos, cobaias, hamsters,

cabras, ovelhas, porcos, cavalos, cães domésticos, raposas selvagens ou em cativeiro, gatos domésticos, e em uma variedade de carnívoros exóticos incluindo primatas e seres humanos ^{43, 18}; existindo ainda alguns casos descritos em aves, nos Estados Unidos ³ e Indonésia, por *E. hellem* ¹⁸. Relativamente por *E. intestinalis* foram descritos casos de infecção em espécies pecuárias, no México; e em gorilas, na África ¹⁸; e, por *Encephalitozoon lacertae* foi apenas identificada em répteis ¹⁸.

3.4.1.1 *Encephalitozoon cuniculi*

O *Encephalitozoon cuniculi* é pertence ao Filo Microspora, que infecta primariamente coelhos, mas também pode ser encontrado em outras espécies de mamíferos, incluindo roedores, cobaias, raposas, macacos, gatos, cães, ovinos, caprinos e suínos ^{4, 5, 6}. É um pequeno organismo medindo de 1,5 -1,6 µm conhecido anteriormente como *Nosema cuniculi* ¹⁰.

Com base em técnicas imunológicas e moleculares, três estirpes foram identificadas, sendo esta divisão baseada no número de repetições GTTT no DNA ribossômico ¹⁸:

a) **Estirpe I (estirpe coelho)** – Apresenta três repetições 5'-GTTT-3'. Afeta coelhos, roedores ¹⁸ e seres humanos conforme relatos encontrados ^{44, 45, 46}. Até os dias de hoje, todos os isolados de coelhos pertencem apenas a esta estirpe ^{47, 18};

b) **Estirpe II (estirpe rato)** – Duas repetições 5'-GTTT-3'. Identificadas em roedores e em raposas de cativeiro, o que suporta a hipótese de roedores atuarem como reservatórios de *E. cuniculi* para as raposas ¹⁸. Também identificada em cães ⁴⁸;

c) **Estirpe III (estirpe cão)** – Quatro repetições 5'-GTTT-3'. Identificadas em cães, raposas, recentemente em fezes de suínos ^{48; 49; 50} e também em seres humanos ⁴⁶.

As três estirpes diferem na sua distribuição geográfica: a estirpe I, já foi identificada em coelhos na América, Austrália e Europa; a II, só foi identificada na Europa; e a estirpe III, na América e África do Sul (foi recentemente identificada numa colônia de macacos na Europa. Mas existe a hipótese de ter sido importada por animais provenientes dos Estados Unidos ¹⁸. Em indivíduos imunodeprimidos foram identificadas as estirpes I, na Europa; a II, na América e Europa ¹⁸; e a do tipo III, na América, Europa e Japão ^{44, 45, 46}. Vários tipos de células em mamíferos, incluindo o homem, podem ser invadidas por este tipo ⁴⁰. Mais informações sobre esta forma de microsporidiose vêm a partir das referências sobre a incidência de infecções naturais e experimentais em coelhos, roedores, carnívoros, primatas e outras espécies. Os animais que podem ser acometidos são:

- **Coelho** : A Encefalitozoonose em coelhos de laboratório e animais de estimação é de importância clínica em todo o mundo. A doença é ainda altamente endêmica na população de coelhos de estimação. Baseado em evidências sorológicas foi observado o *Encephalitozoon cuniculi* como causa de infecção natural em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) ^{51, 29}.

- **Roedores**: Tal protozoário também foi identificado em animais de laboratório (hamsters, ratos, ratazanas, cobaias e porquinhos - da- Índia) ^{40, 29}. Mas atualmente com as medidas higiênicas e sanitárias adotadas, já não representam um problema significativo nestes animais ¹⁸. Informações sobre o possível significado e epidemiologia de microsporidiose em roedores mantidos como animais de companhia e em roedores selvagens é escasso; entretanto, em ratos selvagens já foram identificados anticorpos anti-Encephalitozoon *cuniculi*, podendo estes atuarem como reservatório de infecção para outros animais ^{18,52}.

- **Carnívoros**: A Infecção natural em carnívoros com *E. cuniculi* tem sido descrita em raposas e em cães domésticos ²⁹. No gato existem três casos descritos, com espasmos musculares, depressão, paralisia e morte ^{53, 40, 54}. Também relatado em um estudo recente, a ocorrência de catarata em 19 gatos associado ao *E. cuniculi* ⁵⁵. Ao contrário da infecção subclínica assintomática

visto em coelhos e roedores imunocompetentes, a encefalitozoonose é uma doença esporadicamente fulminante em carnívoros neonatos⁵⁶; já nos adultos, é assintomática, e estes podem excretar esporos por longos períodos servindo então como reservatório da infecção para seres humanos. Portadores crônicos representam maior fonte de contaminação ambiental para os seus descendentes^{57, 29, 18}. Em raposas da Europa do Norte, a infecção causada pela estirpe II é um problema grave que causa imensas perdas econômicas.^{29; 47, 58}. No cão é causada pela estirpe do tipo III, sendo a manifestação clínica uma síndrome nefrite-encefalite, (antes confundida com cinomose)⁵⁹, já descrita na Tanzânia, África do Sul e Estados Unidos da América^{29; 60, 18, 59, 40}.

- **Ruminantes:** Em vacas, o *E. cuniculi* foi primeiramente descrito por Reetz (1995). O exame imuno-histoquímica revelou a presença de microsporídios, provavelmente de *E. cuniculi*, na placenta, cérebro, fígado, rins, miocárdio e pulmões de fetos abortados. Relatos anteriores demonstram uma maior predisposição para infecção em bovinos afetados pelo vírus da leucemia bovina⁶¹. Em caprinos, o *E. cuniculi*, (*Nosema cuniculi*) foi primeiramente descrita em 1971⁶². Tem sido também descrito como agente oportunista infeccioso responsável pela infertilidade e abortos em cabras. É importante o fato também de que as cabras infectadas por microsporídios *Encephalitozoon cuniculi* podem representar uma fonte potencial de infecção para pessoas, especialmente para criadores e veterinários⁶³. E, assim como em coelhos, há uma probabilidade de que a encefalitozoonose possa causar perdas econômicas em criações de gado e caprinos⁶¹.

- **Cavalos:** O *Encephalitozoon cuniculi* tem sido associado a casos naturais de abortos e natimortos em cavalos. Dois relatos de infecção por *E. cuniculi* em cavalos foram encontrados na literatura^{64, 65} e ambos indicam que o *E. cuniculi* podem causar problemas reprodutivos em cavalos.

- **Macacos:** Existem relatos de infecção espontânea por *E. cuniculi* nestes primatas, e, que têm sido melhor documentada em mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*)^{66, 67}, sendo esta Infecção tipicamente subclínica e de lesões graves não aparentes⁶⁸. Infecções naturais

disseminadas, podem resultar em alta morbidade e encefalite severa. E, no caso de transmissão horizontal e intrauterina, o último provoca encefalite granulomatosa multifocal e também placentite. Uma vez que infecções naturais causam a morte neonatal e (ou) infecções letais em macacos jovens; infecções experimentais de macacos imunocompetentes, com isolados derivados de cão ou coelho, resultam em infecções assintomáticas ^{69, 4, 70}. Portanto, muitos fatores, incluindo espécies hospedeiras, cepa do *E. cuniculi*, idade, estado imunológico do hospedeiro e o modo de transmissão, tudo isto pode influenciar o resultado de infecções em macacos.

- **Seres humanos** : A primeira infecção por *Encephalitozoon cuniculi* relatada em seres humanos, foi em 1959 ⁷¹. Outros casos subseqüentes foram diagnosticados somente com base na morfologia de esporos. Portanto, não podendo inequivocamente serem atribuídos ao *E. cuniculi*, já que a diferenciação de espécies não foi possível naquele momento. Entretanto, estudos imunológicos e moleculares mais recentes com *E. cuniculi* tem demonstrado o agente em pacientes portadores do HIV ou transplantado na Europa e Estados Unidos ¹⁸. A distribuição no organismo é semelhante a dos coelhos ²⁹. Em estudo, Mathis *et al.* (1997), verificaram que isolados de *E. cuniculi* provenientes de humanos infectados com o vírus HIV eram indistinguíveis dos isolados de coelhos, o que confirma uma natureza zoonótica de *E. cuniculi* ⁷³. Em uma pesquisa com 456 seres humanos, foi verificada uma prevalência de infecção de 5,6%.

- **Outras espécies**: Há um número crescente de relato de infecção espontânea por microsporídios em psitacídeos, incluindo Agapornis (*Agapornis spp.*), periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), e papagaios Ecletus (*Eclectus roratus*) ^{74, 75, 76, 77}. Em muitos dos relatos iniciais, o agente etiológico foi identificado como *E. cuniculi*, mas as análises moleculares revelaram que infecções em psitacídeos são causadas por *E. hellem* ⁷⁴. As aves infectadas são jovens e freqüentemente são co-infectadas com outros patógenos.

3.4.2 Morfologia

Embora microsporídios sejam organismos eucarióticos, eles mostram algumas características atípicas em relação a uma célula eucariótica, como a falta de peroxissomos e mitocôndrias²⁰. No entanto, mesmo com a ausência de mitocôndrias, enzimas com funções mitocondriais tem sido detectadas³⁶. Seu aparelho de Golgi é atípico^{78, 79} e o RNA ribossômico assemelha-se aos dos procariontes ao invés de eucariontes⁸⁰.

O núcleo no microsporidio existe tanto como um monocariótico, observado em espécies de *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora* e *Trachipleistophora*, ou como um dicariótico observado em espécies de *Brachiola*, *Nosema* e *Vittaforma*²⁹.

O esporo (parte infectante) é uma célula altamente organizada, de formato oval, medindo aproximadamente 1.0–3.0 μm x 1.5–4.0 μm (micrômetro)^{40; 81}. Apresenta um aparelho de extrusão espiral longo, denominado filamento polar ou tubo polar¹⁸, e a forma como o filo *Microspora* infecta uma célula, é por meio dessa estrutura, encontrado espiralado junto ao esporo⁴⁰. O filamento polar é uma estrutura exclusiva do microsporídios²⁰. Os esporos de microsporídios maduros contêm um vacúolo posterior distinto, e na região anterior, contêm um disco de ancoragem e um aparelho de Golgi atípico chamado também de polaroplasto.⁴⁰ A membrana celular do esporo, está unida a duas paredes externas rígidas: o exosporo (constituída por uma matriz proteinácea, densa e granulofibrosa, com uma superfície externa lisa) e o endosporo (constituída por alfa-quitina e proteínas). A espessura do endosporo é constante, exceto no ápex onde é consideravelmente mais fina. No interior da membrana está o esporoplasma, o material infeccioso do esporo, um núcleo e ribossomas¹⁹. No esporo são essas três estruturas responsáveis pela infecção:

- Polaroplasto – constituído por uma série de membranas, que na zona anterior formam o polaroplasto lamelar, e na posterior, o polaroplasto vesicular;

- Filamento ou tubo polar – formado por uma membrana e camadas de glicoproteínas. Unido ao ápex do esporo pelo disco de ancoragem, a partir do qual se estende para a zona anterior do esporo. Um terço até metade do tubo polar é linear, enquanto o restante está disposto de forma helicoidal rodeando os outros constituintes do esporoplasma (Figura 1).

- Vacúolo Posterior- local onde termina o tubo polar.

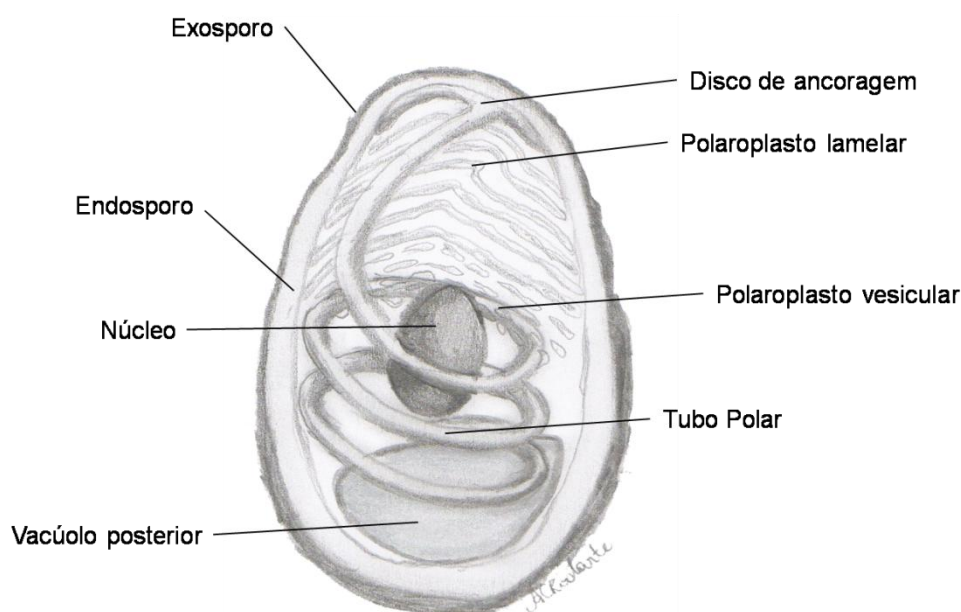


Figura 1- Esporo de *Encephalitozoon cuniculi*. (Adaptado de Kelling e Fast, 2002)

3.4.3 Ciclo Biológico

Todos os microsporídios possuem um ciclo de vida intracelular obrigatório, sendo os esporos resistentes ao meio ambiente ⁴⁰. O ciclo de vida em mamíferos é simples e direto, tendo uma duração de 3 a 5 semanas ¹⁴. A maioria das infecções de microsporídeo em mamíferos acredita-se que ocorra através da ingestão ou inalação de esporos. A transmissão vertical ou transplacentária de microsporidiose não foi relatada em humanos, mas tem

sido relatada em carnívoros, incluindo raposas e cães domésticos, ocasionalmente, macacos, cavalos, coelhos e roedores^{82, 83, 84}. Raramente os microsporídeos são transmitidos por contato direto ou trauma⁴⁰. Infecções experimentais por microsporídeos tem sido transmitidas a animais de laboratório pelas vias intraperitoneal, intravenosa, retal, intratraqueal, intracerebral e inoculações^{85, 82}.

Embora a extrusão do tubo polar seja designada como mecanismo primário pelo qual o micro-organismo estabelece infecção intracelular, pesquisas in vitro do *Encephalitozoon* spp. sugerem que a fagocitose do esporo pela célula hospedeira pode estabelecer infecção intracelular^{40, 86}.

O local da infecção primária depende da via de transmissão e normalmente ocorre nas células epiteliais do trato gastrointestinal ou respiratório^{85, 82}. Uma vez no trato digestivo, os esporos entram em contato estreito com a mucosa, e infecta macrófagos peritoniais que é transportado no sangue para os órgãos- alvo, tais como os rins, fígado e o sistema nervoso central, bem como os pulmões e coração¹⁵. Dentro da célula hospedeira, o ciclo de vida inclui um estágio proliferativo de merogonia (divisão celular), seguido da esporogonia, na qual ocorre a diferenciação e maturação, tornando-se esporo²². O esporo penetra na célula hospedeira através do tubo polar¹⁸, o protoplasma dilata e o disco de ancoragem estabiliza o tubo. O tubo polar é invertido ao mesmo tempo que ocorre sua extrusão, e membranas do protoplasto ligam-se ao tubo para aumentar o seu comprimento. O vacúolo posterior dilata e força o esporoplasma e o núcleo através do tubo polar¹⁴. No interior da célula hospedeira, a extremidade do tubo polar envolve o esporoplasma de modo a formar a membrana externa do parasita¹⁴. No vacúolo parasitóforo, delimitado pela membrana celular da célula hospedeira, o esporoplasma, por divisão binária, origina merontes, sendo esta a fase proliferativa principal²⁹. Os merontes podem sofrer várias divisões antes da sua transformação em esporontes¹⁴. Nesta fase, existe uma grande dependência dos organelos e metabolitos da célula hospedeira, uma vez que os parasitas não possuem os genes que codificam diversas vias de síntese⁸⁷;

⁴⁸. Os esporos transformam-se em esporoblastos imediatamente ou após uma divisão, e, é neste estágio que é sintetizado o tubo polar e as organelas necessárias para o esporo maduro ²⁹. Quando a célula hospedeira está repleta de esporos maduros, estes sofrem ruptura e são liberados ^{20; 14}.

Após a liberação dos esporos, estes são eliminados com as fezes durante as primeiras fases de infecção intestinal ou, mais frequentemente, disseminam-se pelo organismo hospedeiro atingindo outros locais como o rim e trato respiratório ²⁰. Sendo os esporos posteriormente eliminados nas secreções respiratórias ou urina ^{88, 89, 90}. Este processo de disseminação, ocorre por extensão direta para as células mais próximas ²⁹ e/ou através da corrente sanguínea, a qual é alcançada pelo tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal ¹⁸. Através da corrente sanguínea, o parasita dissemina-se, inicialmente, até os órgãos com maior fluxo sanguíneo, como o cérebro, pulmão, rins e fígado ⁹¹, na forma de esporos livres ou no interior de monócitos ⁹². Quando ocorre transmissão transplacentária os esporos podem alcançar a cápsula anterior do cristalino ⁹³.

A ruptura da célula está associada com a resposta inflamatória ⁹⁴, e a inflamação crônica resulta em desenvolvimento de lesões granulomatosas primeiramente nos rins e sistema nervoso central, embora outros órgãos como fígado e coração também podem ser afetados. E essas lesões por sua vez, podem resultar em pneumonia intersticial granulomatosa, hepatite focal intersticial granulomatosa, nefrite intersticial granulomatosa, meningoencefalite granulomatosa focal não-supurativa e uveíte facoclástica ⁹⁵.

A excreção de *E. cuniculi* ocorre através da urina e das fezes ou secreção do trato respiratório ^{96, 93}, tendo início cerca do 35º dia pós-infecção e continuando, de forma intermitente ^{18; 96} por dois a três meses ¹⁴.

Em infecções experimentais observou-se que os anticorpos se desenvolvem aos 21 dias pós-inoculação e que os esporos são eliminados na urina por, aproximadamente, 63 dias ²⁹. Nos coelhos, os anticorpos maternos anti-*Encephalitozoon cuniculi* passam para a descendência e persistem até às

quatro semanas de idade ^{97,18}. De quatro a oito semanas de idade os coelhos são soronegativos ^{17; 9} e, com dez semanas, inicia-se a produção de anticorpos nos coelhos infectados *in utero* ⁴² (Figura 2).

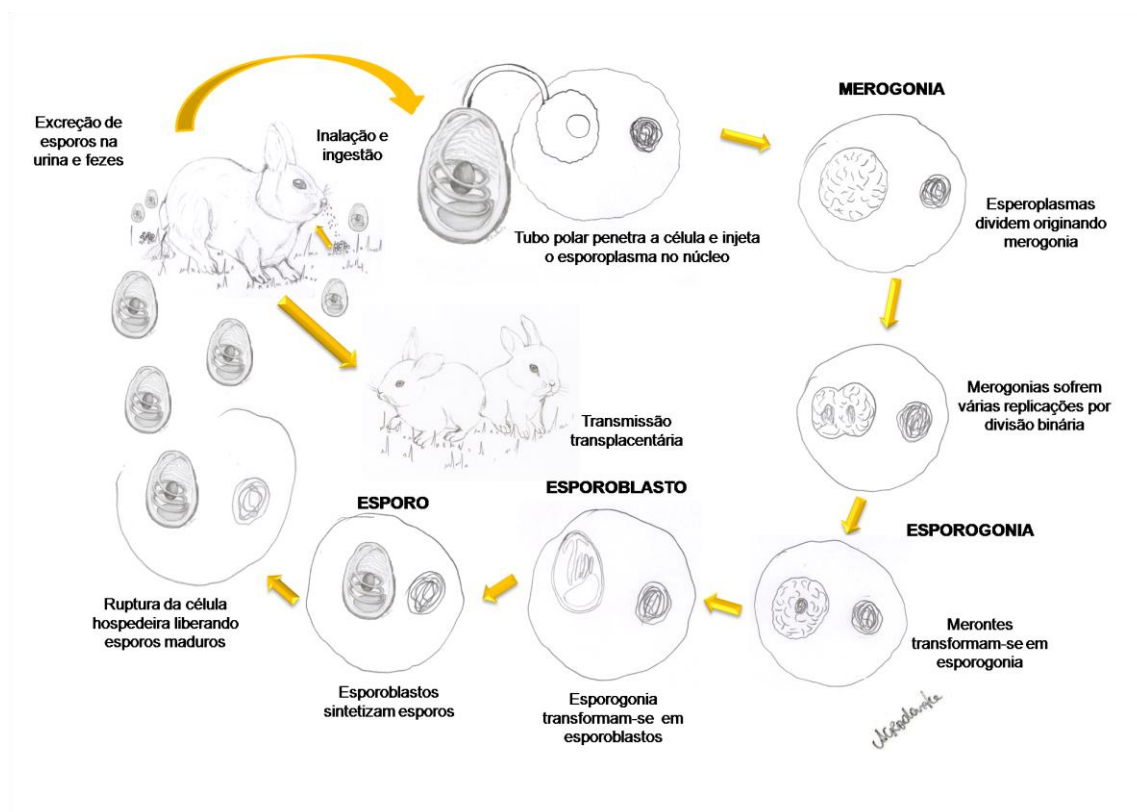


Figura 2 - Ciclo de vida de *Encephalitozoon cuniculi* (Adaptado de Jordan et al, 2006).

3.4.4 Sinais Clínicos

O curso clínico da microsporidiose depende do estado imunológico do hospedeiro e do local da infecção. ^{82; 98}, sendo os sinais clínicos mais severos em cães, macacos e porquinhos-da-índia ⁹⁵.

Coelhos acometidos por encefalitozoonose mostram uma ampla margem de sinais clínicos de assintomática à morte súbita. A doença pode ser aguda ou crônica ⁴². Na fase aguda de infecção, que tem a duração de cerca de trinta dias, os esporos disseminam-se por diferentes órgãos:

coração, pulmão, fígado e baço ²⁹. Esta fase é normalmente assintomática e as lesões limitadas ⁹⁹. Na fase crônica (noventa dias pós infecção) o parasita localiza-se no cérebro, rins e olhos ¹⁴. Pode-se assumir que a relação entre o parasita e o hospedeiro é, normalmente, de equilíbrio ^{14; 93}, uma vez que o parasita pode permanecer por um longo período de tempo nestes locais sem causar qualquer tipo de sintomatologia ⁹³. Infecções crônicas clinicamente silenciosas geralmente são desenvolvidas em hospedeiros imunologicamente competentes e que foram naturalmente ou experimentalmente infectados com *E. cuniculi*. Em alguns casos, no entanto, hospedeiros imunocompetes desenvolvem leves sinais clínicos logo após infecções. ^{82; 98}.

A replicação do parasita leva à ruptura das células hospedeiras, liberação de esporos e inflamação ⁹³. Quando esta liberação ocorre em grande escala desenvolvem-se sinais clínicos em alguns hospedeiros que não conseguem controlar a infecção, enquanto outros conseguem ultrapassar este estágio sem revelar sinais clínicos ^{14; 93}.

As lesões são causadas no sistema nervoso central, rim ou olhos. Coelhos que sofrem de encefalitozoonose podem demonstrar sinais neurológicos, falência renal ou uveíte facoclastica. As três formas desta doença pode ocorrer individualmente ou em combinação ¹⁰⁰. A maioria dos coelhos demonstra sinais clínicos pouco específicos uma vez que a apresentação desta doença é, normalmente, subclínica. Deste modo, pode facilmente passar despercebida se o animal está contido numa jaula ou se o proprietário não é um observador atento ⁹⁹.

3.4.4.1 Sinais Neurológicos

Sinais neurológicos são manifestações clínicas mais comuns em infecções pelo *E.cuniculi*. Em muitos casos, o início dos sinais clínicos é repentino e geralmente segue um evento estressante na vida do coelho ¹⁰⁰.

As alterações neurológicas mais frequentes ocorrem no cérebro, no tronco encefálico mas também no cerebelo ⁹³, desenvolvendo meningoencefalite granulomatosa ¹⁴. O início da sintomatologia pode ser agudo e severo ⁹⁹, podendo, inclusive, causar morte súbita ⁴².

A encefalitozoonose parece ser a causa mais frequente de síndrome vestibular em coelhos ^{101, 42, 102}. Neste caso, a sintomatologia mais comum é a inclinação da cabeça (“head tilt”) (

Figura 3 e Figura 4), andar em círculo, ataxia, opistótono, nistagmo e hiperestesia ^{29; 103}. Outros sinais neurológicos comuns são a fraqueza e paresia e paralisia dos membros posteriores ^{96; 93} (Figura 5), com perda de reflexos posturais e reflexos espinhais lentos ^{99; 14}. Podem ocorrer tremores e convulsões ¹⁰³. As convulsões normalmente ocorrem subitamente e os animais podem ficar cegos ou comatosos ou, então, recuperarem-se completamente ¹⁴. As convulsões podem também resultar de alterações na circulação, por mineralização da artéria aorta, devido à insuficiência renal crônica ⁹⁹.



Figura 3- A: Imagem de coelhos positivos para *E. cuniculi*, apresentando Síndrome Vestibular



Figura 4- Imagem de um coelho apresentando leve inclinação da cabeça: em decorrência da infecção pelo *E. cuniculi*.



Figura 5 - A:Imagens de coelhos apresentando paralisia de membros pélvicos devido infecção por *E. cuniculi*.

Nas infecções crônicas podem estar presentes, atitude contemplativa (“stargazing”), perda de equilíbrio, agressividade e perda de audição ou visão.

^{104;42; 14}. As lesões do sistema nervoso central podem causar incontinência urinária ¹⁰⁵ e outros sinais menos específicos como a perda de peso e inapetência ^{101, 10, 106}.

3.4.4.2 Sinais Clínicos Renais

A infecção por *E. cuniculi* é a causa mais comum de falência renal em coelhos ^{107; 108}. A maioria dos casos de nefrite intersticial crônica causada por infecção do *E.cuniculi* são sub-clínicas. Por esse motivo, azotemia é comumente detectada acidentalmente em coelhos. ^{104; 42}

Os sinais clínicos podem ser apresentados por perda de peso ⁹⁹, letargia, anorexia ⁶³, desidratação ^{104; 42}, poliúria, polidipsia e, também por incontinência urinária, embora ainda não seja claro se isto se deve a danos cerebrais ou renais ^{14; 15}. No caso de insuficiência renal crônica, a sintomatologia é não específica, incluindo apatia, anorexia ⁹³ ou convulsões. Anemia também pode ocorrer em coelhos ou mesmo a osteodistrofia resultando em fraturas patológicas dos ossos longos¹⁰⁴

A bioquímica sérica pode demonstrar uma ligeira elevação da ureia sanguínea (“blood urea nitrogen” – BUN) e da creatinina ¹⁴.

3.4.4.3 Sinais clínicos oculares

O Encephalitozoon tem sido reconhecido há algum tempo como a causa de catarata e ruptura de capsula do cristalino em coelhos. Uveíte facoclástica tem sido relatado em muitas espécies de animais domésticos, mas o coelho é relativamente o único em que a ruptura da cápsula é induzida sem antes haver insulto traumático. Ocorre na maioria das vezes, em coelhos mais jovens. ^{109; 110; 103}.

O protozoário entra na lente durante o desenvolvimento intrauterino, quando a cápsula do cristalino é ainda muito fina ou ausente, mais tarde, fazendo com que a lente rompa em seu ponto mais fino da superfície anterior e o material da lente seja lançado para o câmara anterior, levando a uveíte facoclástica ¹¹⁰. A cápsula anterior do cristalino rompida dá origem a uma uveíte granulomatosa focal ¹¹¹. Geralmente relatadas pelos proprietários como uma massa branca visível no interior dos olhos ¹⁰⁴; ¹¹². Se a inflamação for grave pode causar cegueira ¹⁴.

As cataratas podem ser vistas em vários estágios ¹¹³, que em coelhos, são diagnosticadas e associadas a infecção por *E. cuniculi* ¹¹⁴. Desenvolvem-se devido a alterações das fibras do cristalino, mas normalmente sem perda de visão ^{96; 93}. (Figura 6)



Figura 6- Imagens de olhos de coelhos apresentando sinais clínicos oftálmicos
A- Catarata incipiente em cápsula anterior em bulbo ocular esquerdo B- Catarata madura em olho direito, com presença de sinéquia posterior 360° e resquício de íris devido a uma sinéquia

3.4.5 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da encefalitozoonose in vivo é difícil. Sinais de doença neurológica ou renal não excluem outras doenças. A tentativa de diagnóstico clínico é normalmente obtidos pela combinação de sinais clínicos, neurológicas, exames oftálmicos, testes sorológicos, pela exclusão de diagnósticos diferenciais ¹¹⁵ ou sendo necessário um exame histopatológico e a demonstração do parasita ¹⁰³.

A prevalência da infecção por *E. cuniculi* é superior nos coelhos adultos ¹⁷, embora a sintomatologia seja, normalmente, mais grave em animais com menos de seis semanas ^{14, 9}. Não existe predisposição sexual ^{18; 96}.

Os títulos de anticorpos negativos geralmente exclui uma infecção. Esporos raramente podem ser encontrados na ausência de anticorpos específicos, especialmente na fase inicial da infecção ¹¹⁵, ou durante as infecções em uma idade muito precoce ou quando doenças imunossupressores primárias estão presentes ^{116; 80; 115}. A detecção de anticorpos específicos apenas confirmam contacto prévio com o patógeno, muitos coelhos clinicamente saudáveis mostram títulos de moderados a altos ^{99;103;115}. O diagnóstico *posmortem* demonstra esporos em um grande número de animais sem sintomas de encefalitozoonose ¹¹⁵. A infecção parece desenvolver e disseminar-se de forma lenta e os sintomas não se desenvolvem na maioria dos casos ^{104;115}.

A radiografia do crânio pode ajudar no diagnóstico de otite média/interna, que representa o principal diagnóstico diferencial de doença vestibular em coelhos, mas pode levar a resultados falso-positivos ou negativos. ¹⁰²

Um estudo recente documentou que a análise de fluido cefalorraquidiano pode fornecer um diagnóstico clínico de encefalitozoonose em coelhos ¹⁰². Conclui-se, então, que a pleocitose linfomonocitária e o aumento em

concentração de proteínas no LCR são sinais característicos de encefalitozoonose em coelhos. No entanto, qualquer outro vírus, protozoários ou a encefalite imunomediada podem induzir a um resultado semelhante ¹⁰².

3.4.6 Diagnósticos Laboratoriais

3.4.6.1 Sorologia

A sorologia é a ferramenta mais importante para o diagnóstico de infecção por *E. cuniculi* em animal vivo ^{117; 14}, sendo este método mais sensível durante a sua fase inicial de infecção ^{118; 115}. Ela requer o uso de antígenos de microsporídeos que foram desenvolvidos para detectar anticorpos de espécies de microsporídeos que poderiam ser cultivados em cultura. ¹¹⁹

Em coelhos de laboratório, anticorpos séricos contra o *E. cuniculi* desenvolvem-se dentro de três semanas pós-infecção ¹²⁰. A soroconversão pode ser demonstrada, pelo menos duas semanas antes de os organismos intracelulares serem detectados, e, quatro semanas antes de ocorrerem alterações histopatológicas visíveis no rim ou dos esporos serem excretados na urina ⁴². Lesões cerebrais são observadas apenas cerca de 8 semanas após o início da resposta de anticorpos séricos ¹¹⁸. Posteriormente, os títulos de anticorpos permanecem elevados por vários meses após a exposição ao *E. cuniculi*; em seguida, diminuem ligeiramente podendo persistir por anos, em níveis flutuantes ^{121, 122}. No entanto, devido à existência de numerosos animais com um título de anticorpos elevado que não exibem sintomatologia, a titulação não deve ser utilizada como único método de diagnóstico ⁹³. A presença de anticorpos circulantes não tem valor diagnóstico absoluto, apenas confirma a exposição ao *E. cuniculi*. Coelhos soropositivos podem ter uma infecção ativa ou latente, ou ter uma resposta imunitária instalada sem continuarem infectados ^{99; 17}. Além disto, não existe uma diferença significativa entre o título de anticorpos em animais com ou sem sintomatologia ⁹³. A triagem sorológica

pode ser usada em laboratórios para identificar e abater animais potencialmente infectados reduzindo a interferência nos resultados experimentais ¹⁰. Uma vez que, o animal apresente sinais clínicos compatíveis com a encefalitozoonose, um título de anticorpos anti-*Encephalitozoon cuniculi* negativo é suficiente para excluir o mesmo como o agente etiológico da doença em curso ⁹³.

Vários testes e diagnóstico têm sido desenvolvidos, a fim de detectar anticorpos para o *E. cuniculi*, e, todos são adequados para o uso em coelhos. ^{117; 14} Como testes sorológicos podemos citar:

- Teste de IFI (imunofluorescência indireta): é considerado o método preferencial. Segundo estudos recentes, este mostra que, títulos iguais ou superiores a 40, indicam a soropositividade do animal. ¹²⁴ Deve-se ter atenção que em coelhos com infecção aguda não existe correlação entre o título de anticorpos e a quantidade de esporos excretados ou a severidade das lesões encontradas na necropsia ⁹⁹.

- Testes ensaio imuno-enzimático (“enzyme-linked immunosorbent assay” – ELISA) e imuno-ensaio de carbono (“carbon immunoassay” – CIA): ambos são igualmente sensíveis e específicos ¹⁷

- Eletroforese de proteínas: associado ao teste de ELISA, apresenta alta sensibilidade, podendo assim, ser útil no diagnóstico da doença. ¹²⁵

- O teste de soro por aglutinação direta: considerado também um teste eficaz para a detecção de anticorpos de *E. cuniculi* em ratos e coelhos, com uma sensibilidade de 86% e especificidade de 98%. Pode ocorrer reação cruzada com *E. intestinalis*, e não são necessários reagentes específicos, mas necessita de um grande número de esporos da cultura de tecidos ¹⁴.

- Teste fluorimétrico: comparado em recente estudo ao teste de imunofluorescência indireta, mostra ser útil no diagnóstico de microsporídeos em seres humanos, mesmo em casos de ausência de imunodeficiência; como em estudos soropidemiológicos, sendo utilizado também para detectar e

controlar infecções em coelhos e animais de estimação capazes de transmitir doenças aos seres humanos¹²⁶

- India-ink immunoreaction : comparado aos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e ao teste de hipersensibilidade cutânea (SH). É citado na literatura como método que parece ser rápido, confiável e conveniente para o diagnóstico da encefalitozoonose em coelhos¹²⁷.

- Teste de imunoperoxidase: comparado ao teste de imunofluorescência, mostrou-se um teste sensível e confiável para o diagnóstico do *E.cuniculi*.¹²⁸

3.4.6.2 Microscopia óptica

O diagnóstico definitivo de microsporidiose em seres humanos, ainda depende da detecção de organismos, sendo a observação de amostras de tecidos ou secreções úteis no diagnóstico. Podem ser observados esporos em biópsias renais a partir das cinco semanas após a produção de anticorpos. Em caso de uveíte, os esporos podem ser identificados em material liquidificado do córtex do cristalino¹⁴.

As colorações permitem a identificação de esporos, no entanto, permitem apenas a identificação do gênero, mas não da espécie^{29; 18}. Existe também a desvantagem dos esporos serem confundidos com bactérias¹⁴. Colorações são comumente usadas para detectar microsporídeos em amostras de fluidos tais como: urina, fezes, ou aspirados^{129,90,130}. Devido ao pequeno tamanho dos esporos, técnicas de coloração de rotina como hematoxilina-eosina é difícil, sendo outros métodos de coloração considerados mais sensíveis¹²⁹. O método de coloração mais sensível, mas não específico (os esporos podem ser confundidos com bactérias), para Microsporidia é “Calcofluor white M2R” (CW-M2R), que é uma coloração quimiofluorescente que pode ser utilizada em amostras de urina ou fezes¹⁴. Outra coloração é a “acid fast trichome” (AFT) que além de ser utilizada para a identificação de esporos em sedimento de urina¹⁰⁸ pode ser utilizada em histopatologia, em amostras de rim ou cérebro⁹³. Os esporos surgem cor-de-rosa brilhante e, frequentemente, observa-se o vacúolo posterior e uma risca diagonal cor-de-rosa¹³¹. Existe também a

coloração de Ziehl-Neelsen que pode ser utilizada em amostras de rim e cérebro, sendo ligeiramente mais sensível que a AFT ⁹³.

3.4.6.3 Microscopia Eletrônica

A Microscopia eletrônica é considerada padrão ouro "para a detecção de microsporídeos ¹³², tomando como base a observação do filamento polar nos organismos ⁹⁰, sendo importante para observar e descrever as características ultraestruturais de desenvolvimento e organismos maduro. ¹²⁹ Permite também a diferenciação entre as quatro espécies de Microsporidia que mais comumente infectam os animais e os seres humanos: *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem* e *Enterocytozoon bieneusi* ¹⁴. Seu uso é considerado não prático na maioria das instalações, devido ao seu alto custo e demora, para o diagnóstico de rotina. ¹²⁹

3.4.6.4 Métodos Moleculares (PCR)

A reação em cadeia da polimerase ("polymerase chain reaction" – PCR) ainda não está suficientemente avaliada para a detecção de DNA do *E. cuniculi* em coelhos ¹⁰³. É uma técnica adequada para a detecção de *E. cuniculi* em material emulsificado ou liquidificado do cristalino, talvez devido à elevada concentração de esporos neste local. ^{133,115} Para os outros tecidos, a técnica de PCR-"nested" tem uma sensibilidade superior à técnica convencional, sendo o cérebro o local mais indicado para a colheita de material, seguido do rim ⁽¹¹⁵⁾. Esta técnica pode também ser realizada a partir de amostras de fezes ou urina ¹⁴, sendo o uso em coelhos menos comum. ^{134; 115}. Já existem "primers" específicos para o *E. cuniculi*, o *E. hellem* e o *E. intestinalis*, mas só se encontram disponíveis em laboratórios de investigação ¹⁴.

3.4.6.5 Exame pós morte e histopatologia.

No exame *postmortem* podem ser observadas lesões em vários órgãos, mas principalmente no cérebro, rim e olho, sendo estes os locais preferenciais para recolha de material para exame histopatológico ^{29; 93}.

Na fase aguda, as alterações patológicas são localizadas nos pulmões, fígado e rins; enquanto em estágios crônicos, rins, cérebro e coração são os mais afetados ¹²⁰.

No sistema nervoso, alterações histopatológicas só são observáveis quatro semanas após a seroconversão ou aproximadamente oito semanas após a infecção ¹³⁵. O exame histológico do tecido cerebral normalmente revela meningoencefalite com infiltrações perivascular que vão desde alterações discretas a meningoencefalites granulomatosas não supurativa, focal ou multifocal ^{118, 136, 137; 93}. Os granulomas contém linfócitos e células gliais ^{138; 93}. A área mais acometida é o cérebro (córtex e medula), mas as lesões inflamatórias também podem ser encontradas no tronco cerebral e na medula espinhal em menor grau no cerebelo ^{122;93}. Ocasionalmente, a radiculite espinhal focal é observada ¹³⁹, que pode ser responsável por sintomas neurológicos atípicos.

No exame macroscópico do sistema renal é frequente encontrar os rins atrofiados, fibróticos e pálidos, com pequenas depressões na superfície e manchas irregulares branco-acizentadas; sinais estes, que podem ser achados acidentalmente no *posmortem* ¹⁴⁰. Em casos agudos podem encontrar-se aumentados e com manchas esbranquiçadas ¹⁴¹. Lesões no tecido renal incluem nefrite granulomatosa focal, principalmente com células mononucleares. Também são frequentemente documentados, graus severos de nefrite intersticial crônica com formação cicatricial macroscópica no tecido devido à fibrose, e granulomas multifocais ^{142; 118; 137; 93}. Em infecções crônicas, as lesões mais frequentes são focos irregulares e deprimidos no córtex renal ²⁹.

No exame macroscópico do olho pode ser observado um nódulo inflamatório branco aderente à lente no local da ruptura da cápsula de lente que estende-se no interior da câmara e úvea anterior ¹⁴³, sendo o mesmo, resultante da ruptura do cristalino ¹⁴⁴. No exame histológico pode-se observar reacção inflamatória centrada no local de ruptura do cristalino e uma uveíte granulomatosa local ^{99; 14}.

A uveíte facoclástica, consequência de infecção intrauterina caracteriza-se pela infiltração da lente do olho por várias células inflamatórias (granulócitos, macrófagos, células gigantes). A íris e o corpo ciliar são infiltrados por células plasmáticas e linfócitos. Os parasitas são encontrados somente na lente ¹¹².

3.4.7 Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico diferencial inclui as infecções pelo protozoário *Toxoplasma gondii* ^{97,99}, e pela bactéria *Listeria monocytogenes* ^{29; 93}. Sendo a Toxoplasmose uma rara causa de doença neurológica em coelhos e as infecções geralmente subclínicas. Comparada a encefalitozoonose, coelhos com toxoplasmose clínica em sua maioria apresentam sinais inespecíficos tais como: inapetência, letargia e febre ¹⁴⁵, podendo induzir meningoencefalites granulomatosas semelhantes às das causadas pela encefalitozoonose mas que pode ser diferenciada por meio de testes sorológicos, morfologia do tecido e imunohistoquímica ^{145, 146}.

Além da encefalitozoonose, a otite interna e/ou média representam um dos principais diagnósticos diferenciais para distúrbios vestibulares em coelhos, sendo na maioria dos casos *Pasteurella multocida*, o principal agente infeccioso levando a otite em ambas as orelhas. ¹⁰¹ Ocorre mais comumente em coelhos criados intensivamente ⁹⁹ e a sintomatologia pode assemelhar-se à provocada pelo *E. cuniculi*. *P. multocida* que causa síndrome vestibular periférica enquanto o *E. cuniculi* leva a síndrome vestibular central, apesar da infecção por *P. multocida* poder causar uma síndrome vestibular central se existirem abscessos ao longo do trato vestibular ^{99; 14}. Em contraste com coelhos que apresentem doença vestibular devido a uma infecção por *E. cuniculi*, *P. multocida* geralmente está associada com sinais de infecção no trato respiratório superior (espirros, corrimento nasal) e, ocasionalmente, pneumonia ¹⁴⁷. Na radiografia das bolhas timpânicas podem ser observadas alterações em otites médias crônicas causadas por *P. multocida* ⁹⁹.

No caso de paresia dos membros pélvicos e ataxia, o diagnóstico diferencial deve incluir situações de doença espinhal, comuns em coelhos, devido à sua predisposição a fraturas espinhais e subluxações. A espondilose, dor da articulação coxofemoral e doença degenerativa discal devem também ser consideradas no diagnóstico diferencial ⁹⁹. Lesões cardiovasculares, metabólicas, tóxicas e degenerativas do sistema nervoso central também devem ser consideradas como diagnóstico diferencial de distúrbios neurológicos em coelhos ¹⁴⁸. Meningoencefalite por infecções bacterianas também é detectado com frequência como causa de doença neurológica em coelhos ^{149, 148}. Raramente Infecções virais que acometem o sistema nervoso central, incluindo o herpes vírus e vírus da raiva podem induzir doença neurológica em coelhos ^{150, 151, 152}.

Ocasionalmente, otite externa, devido à infecção *Psoroptes cuniculi* pode estar associada a uma inclinação de cabeça transitória, mas não desempenham papel nesta condição ¹⁰¹.

Em coelhos, lesões neoplásicas, com maior frequência os linfomas, também estão documentados por envolver o sistema nervoso central, sendo considerado um diagnóstico diferencial ¹⁴⁸.

Outras entidades a ter em conta é a deficiência de vitamina E e/ou selênio ¹²⁴, assim como as intoxicações por substâncias tóxicas. ¹⁵

No caso de incontinência urinária, o diagnóstico diferencial para esta manifestação na encefalitozoonose inclui infecção do trato urinário, urolitíase, incapacidade de elevar os membros posteriores devido a dor na articulação coxofemoral, doença espinhal, obesidade e artrite ^{99; 15}. Sendo, portanto, a radiografia ou o exame ultrassonográfico, um excelente auxílio no diagnóstico diferencial da doença. ⁴²

Nas uveítes facoclósticas em coelhos, o diagnóstico diferencial pode ser uveíte bacteriana causada por *Pasteurella multocida* pela propagação

hematogena ¹⁵³ e uveíte secundária a ceratite grave ou causada por trauma ou infiltração de corpos estranhos ⁹⁹.

3.4.8 Tratamento

O tratamento tem como objetivo, não somente eliminar o parasita, mas também, reduzir a inflamação, prevenir a formação de esporos e controlar os sinais clínicos resultantes da infecção, uma vez que a eliminação do parasita, por si só, não reverte as alterações crônicas causadas pelo mesmo^{99, 15}. Uma vez que os sinais clínicos de encefalitozoonose não estão apenas associadas a presença do organismo em diferentes tecidos, mas também ao processo inflamatório que segue-se após a eliminação do parasita. As medidas terapêuticas e de controle dependem da manifestação clínica da infecção no sistema nervoso central, trato urinário, olhos ou a combinação desses¹⁵⁴.

Vários estudos in vitro têm sido realizados para avaliar a susceptibilidade do *E. cuniculi* às drogas. Antibióticos, tais como fumagillin, esparfloxacina, oxitetraciclina e anti-helmínticos, incluindo albendazol, oxibendazol e thiabendazole foram considerados os mais eficazes.^{155, 156; 157, 158}

O tratamento com albendazol (15 mg/kg por via oral a cada 24 horas) pode reduzir a sintomatologia e cessar a eliminação de esporos na urina ¹⁴, sendo considerado um medicamento eficaz contra as microsporidioses em seres humanos ¹⁵⁷, mas não sendo indicado em coelhos gestantes devido aos seus efeitos teratogênicos ^{124, 159}.

O fenbendazol também é considerado eficaz para tratar e prevenir a infecção ¹²⁴; sendo considerado a droga de escolha para o tratamento da encefalitozoonose em coelhos ¹²⁴. A dose recomendada é de 20mg/kg/dia, via oral durante 28 dias ¹⁰³. Este tratamento pode ser repetido a cada seis meses, ou em intervalos menores, se a sintomatologia reaparecer ou a condição do coelho se deteriorar ⁹⁹. Tem a desvantagem de apresentar uma absorção menor que o albendazol quando administrado por via oral ⁹⁹.

Coelhos acometidos por sinais neurológicos é indicado terapia anti-inflamatória concomitante a terapia antibiótica¹⁵⁴. Recomenda-se o uso de antimicrobianos de largo espectro como trimetoprim-sulfadiazina (15-30 mg/kg, por via oral, 12/12 horas) ou enrofloxacin (10 mg/kg, via oral, 12/12 horas), por 7 a 10 dias¹⁵, assim como oxitetraciclina (15mg/kg subcutâneo)^{104, 42, 133, 15}.

Nos casos leves ou agudos podem ser utilizados corticosteróides de curta duração, como dexametasona na dose de 0,1-0,2 mg/kg subcutâneo, a cada 48h^{42; 160}. No entanto seu uso no tratamento é controverso, pois sua administração pode conduzir a um aumento da carga parasitária pelo seu efeito imunodepressor¹⁴, sendo avaliado seu uso. Ao utilizar a longo prazo, deve-se optar por doses anti-inflamatórias e não imunodepressoras⁹⁹. Pode-se considerar a utilização de outros agentes anti-inflamatórios como flunixinameglumina ou inibidores COX-2⁹⁹. O uso de benzodiazepínicos, como o diazepam (0,5mg/kg, SC ou IV) ou o midazolam (0,5-2mg/kg, SC ou IV)^{99; 15} em casos de animais que apresentem severos sinais neurológicos, como inclinação da cabeça (head tilt), e andar em círculos podem ser úteis.¹⁵ Recentemente, as opções de tratamento de suporte, tais como redução do estresse e fisioterapia têm se tornado importantes na terapia de coelhos de estimulação com sinais vestibular¹⁶¹.

Na insuficiência renal crônica (IRC), o tratamento é sintomático, sendo essencial assegurar uma ingestão adequada de água e, se necessário, recorrer a fluidoterapia^{107; 103}. É aconselhável uma dieta com baixo teor de cálcio para diminuir o risco de mineralização dos tecidos, uma vez que a eliminação de íons deste elemento pelo rim está comprometida⁹⁹. Casos agudos de incontinência urinária podem ser resolvidos com fenbendazol¹⁵.

Em caso de uveíte o tratamento ideal consiste na emulsificação do cristalino, para a sua remoção ou a enucleação do olho afetado¹⁶⁰ bem como a utilização de medicamentos tópicos^{162, 113}. A emulsificação é um procedimento difícil, mas sem tratamento o olho geralmente atrofia e impõe-se a enucleação^{144, 103}. Em casos pouco severos podem ser utilizados corticosteróides tópicos e sistêmicos em combinação com fármacos anti-protozoários. A combinação de

fenbendazol (20mg/kg/dia), por via oral, com prednisolona a 1% tópica durante oito semanas resolve a uveíte ¹²⁴. Também recomenda-se o uso de pomadas contendo dexametasona e tetraciclina. ¹⁰⁴ No entanto, mesmo com o tratamento tópico, a uveíte conduz, invariavelmente, à atrofia do olho, podendo haver exceções apenas quando o tratamento é iniciado numa fase muito precoce da doença ¹⁴⁴.

Foi relatado também o uso de fumagillin, um antibiótico produzido pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, sendo considerado altamente eficaz quando usado topicamente para tratar ceratoconjuntivites causada por *Encephalitozoon* ^{163, 164}. Quando administrados por via sistêmica para os seres humanos em uma dose de 20 mg três vezes por dia, fumagillin foi altamente eficaz contra *E. bieneusi*, mas causou neutropenia e trombocitopenia em alguns pacientes ¹⁶⁵. Um análogo da fumagillin chamado TNP-470 (também chamado de AGM-1470) foi menos tóxica em animais de laboratório e tão eficaz quanto a fumagillin contra várias espécies de microsporídios em cultura de tecidos e em ratos atímicos infectados ^{166, 167}.

Medicamentos adicionais com resultados variáveis têm sido relatados para o tratamento da microsporidiose em seres humanos, incluem a furazolidona, sinefungin, atovaquona, azitromicina, itraconazol, octreotida e sulfas ¹⁶⁸.

Em alguns casos podem ocorrer uma melhoria espontânea, sem tratamento ⁴². Os casos de sintomatologia nervosa e renal grave podem não responder favoravelmente ao tratamento ¹³⁵.

3.4.9 Profilaxia

Os esporos podem permanecer viáveis em condições ambientais extremas durante algum tempo, em condições seca de temperatura normal em 22 °C, sobrevivendo por 4 semanas em média. São facilmente destruídos pela maioria dos desinfetantes rotina, bem como em água fervente autoclave. ¹⁵.

O estabelecimento de uma colônia de reprodução livre de *E. cuniculi* é possível, mas requer tempo e dinheiro ¹⁵. Devido à elevada percentagem de coelhos saudáveis seropositivos a *E. cuniculi* é aconselhável realizar rastreios serológicos nas populações ^{97,17} e devem ser implementadas medidas de controle eficazes, como altos padrões de higiene, procedendo à limpeza das jaulas com a maior frequência possível e evitando o contato da urina com a água de bebida ^{16; 9}. Níveis de anticorpos séricos podem ser testados a cada duas semanas por dois meses e todos os animais soropositivos, mesmo com títulos baixo, devem ser removidos ^{15,169}.

A soroconversão ocorre 4 semanas antes dos esporos serem eliminados na urina. O uso de sorologias nesse caso, seria útil para confirmação de animais positivos, uma vez que, estes seriam retidos da colônia antes de se tornarem infectantes ¹⁵.

A eliminação de coelhos seropositivos continua a ser o melhor modo de evitar a disseminação do agente e de prevenir esta doença ¹⁵. Em coelhos de estimação, deve-se ter especial cuidado, uma vez que é uma infecção com potencial zoonótico ¹⁷.

Uma grande variedade de estratégias têm sido aplicadas para reduzir a viabilidade e o potencial de infectividade dos microsporídeos no ambiente. O fenol a 2% ou formol a 10% tornam os esporos não infectantes e previnem a transmissão ⁽⁹⁶⁾. O etanol a 70%, aplicado por 30 segundos, inativa os esporos ¹⁷⁰. O hipoclorito de sódio é um desinfetante eficaz contra os esporos do *E. cuniculi* ¹⁴. Uma exposição ao hipoclorito de sódio a 1% durante 30 segundos inativa os esporos, sendo um modo eficaz para a limpeza de jaulas ou outras superfícies possivelmente contaminadas ¹⁴.

O uso de autoclave a 120 °C por 10 minutos e ferver a água por 5 minutos também mostrou-se efetivo para matar esporos do *E. cuniculi*. ¹⁵⁵ A sobrevida e infectividade dos Microsporídeos também foram reduzidos na água por coagulação, decantação e filtração ¹⁷¹. Tratamento de ozônio, exposição aos raios ultravioleta, irradiação gama, e cloração em pH 7 foram eficazes na

redução da viabilidade e infectividade de espécies *Encephalitozoon* ^{172, 173, 174, 175,176}.

Indivíduos em risco para o desenvolvimento de microsporidiose, tais como pessoas com AIDS ou transplantadas, aconselha-se beber água engarrafada ou fervida e lavar as mãos adequadamente ²⁶. Outras estratégias preventivas incluem cozinhar completamente a carne, o peixe e frutos do mar, bem como lavar as frutas e verduras antes da ingestão. Sabendo que os animais podem ser infectados com espécies de microsporídeo que infectam humanos, a exposição limitada à animais suspeitos de transportar tal doença é justificada.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo sobre o *Encephalitozoon cuniculi* é de suma importância na medicina veterinária por tratar-se de uma zoonose que pode por em risco os seres humanos, e, além do mais pode estar presente em todo o ambiente.

A grande dificuldade da encefalitozoonose é o seu diagnóstico já que os sinais clínicos são inespecíficos.

Sendo assim, torna-se relevante o estudo deste agente para o médico veterinário, uma vez que o profissional da saúde pública deve estar pronto para prestar informações e orientações à população sobre sua prevenção e controle.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hollister WS, Canning EU, Willcox A. Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitology*. 1991; 102: 33-43.
2. Deplazes P, Mathis A, Baumgartner R, *et al*. Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon* like microsporidia isolated from humans and

rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clinical Infectious Diseases*. 1996; 22: 557-559.

3. Poonacha KB, Stamper RD. Encephalitozoonosis in a parrot. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1985; 186: 700-702.
4. Shadduck JA, Watson WT, Pakes SP, et al. Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Parasitology*. 1979; 65: 123-129.
5. Pang VF, Shadduck JA. Susceptibility of cats, sheep and swine to a rabbit isolate of *Encephalitozoon cuniculi*. *American Journal of Veterinary Research*. 1985; 46: 1071-1077.
6. Illanes OG, Tiffani-Castiglioni E, Edwards JF, et al. Spontaneous encephalitozoonosis in an experimental group of guinea pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1993; 5: 649-651.
7. Ambroise-Thomas P. Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30: 1361-1367.
8. Costa SF, Weiss LM. Drug treatment of microsporidiosis. *Drug Resist Updat*. 2000; 3: 384-399.
9. Santaniello A, Dipineto L, Rinaldi L, et al. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Research in Veterinary Science*. 2009; 87: 67-69.
10. Pakes SP, Gerrity LW. Protozoal diseases. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*. 2nd edn. Eds P. J. Manning, D. H. Ringler, C. E. Newcomer. San Diego, Academic Press. 1994; 205-224.
11. Igarashi M, Oohashi E, Dautu G, et al. High Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Pet Rabbits in Japan. *Journal Veterinary Medical Science*. 2008; 70: 1301–1304.
12. Lallo MA, Santos MJ, Bonda EF. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. *Revista Saúde Pública*. 2002; 36: 621-6.
13. Fournier S, Liguory O, Sarfati C, et al. Disseminated infection due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: case report and review. *HIV-Medicine*. 2000; 3: 155-161.

14. Jordan, CN, Zajac AM, Lindsay DS. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 2006 a; 28; 108-116.
15. Keeble EJ, Shaw DJ. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 2006; 158 (16): 539–544.
16. Boucher S, Novaille L. Manuel pratique des maladies des lapins. France Agricole éd., Paris, 1996; 25.
17. Dipineto L, Rinaldi L, Santaniello A, *et al.* Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses and Public Health*. 2008; 55: 173-175.
18. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18: 423–445.
19. Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology*. 2002; 56:93-116.
20. Dider ES, Stovall ME, Green LC, *et al.* Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*. 2004; 126:145-166.
21. Shadduck JA. *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. *Science*. 1969; 166: 516-517.
22. Didier ES. Microsporidiosis: an emerging opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*. 2005; 94: 61-76.
23. Schmidt EC, Shadduck JA: Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. *Infect Immun*. 1983; 40: 936-942.
24. Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, *et al.* Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *Journal of Protozoology*. 1985; 32: 250–254.
25. Orenstein JM. Diagnostic pathology of microsporidiosis. *Ultrastructural Pathology*. 2003; 27: 141–149.

26. Bryan RT, Schwartz DA. Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner, M., Weiss, L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC. 1999; 502–516.
27. Deplazes P, Mathis A, Weber R. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contributions to Microbiology*. 2000; 6: 236–260.
28. Franzen C, Muller A. Cryptosporidia and microsporidia—waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1999; 34: 245–262.
29. Wasson K, Peper RL. Mammalian microsporidiosis. *Veterinary Pathology*. 2000; 37: 113-128.
30. Cali A, Takvorian P. Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In: Wittner, M., Weiss, L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC. 1999; 85–128.
31. Canning EU, Vavra J. Phylum Microsporidia. In: Lee, JJ, Leedale, GF., Bradbury, P. eds.), *The Illustrated Guide to the Protozoa*. 2nd ed. Society of Protozoologists, Lawrence, KS, USA. 2000; 39–126.
32. James TY, Kauff F, Schoch CL, *et al.* Reconstructing the early evolution of *Fungi* using a six-gene phylogeny. *Nature*. 2006; 443: 818-822.
33. Hibbet DS, Binder M, Bischoff J, *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological Research*. 2007; 3: 509--547.
34. Keeling PJ, McFadden GI. Origins of microsporidia. *Trends in Microbiology*. 1998; 6:19–23.
35. Biderre C, Mathis A, Deplazes P, *et al.* Molecular karyotype diversity in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitology*. 1999; 118: 439–445.
36. Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, *et al.* Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 2001; 414: 450–453.
37. Becnel JJ, T. G. Andreadis. Microsporidia in insects. In: M. Wittner (ed.), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C. 1999; 1-6.

38. Lom J. A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Systematic Parasitology*. 2002; 53: 81– 99.
39. Shaw RW. Fish microsporidia. In: M. Wittner (ed.), *Microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C. 1999; 447-501.
40. Canning EU, J. Lom. The microsporidia of vertebrates. Academic Press, London, United Kingdom. 1986;289.
41. Coyle CM, Weis LM, Rhodes III LV, *et al.* Fatal myositis due to the microsporidian *Brachiola algerae*, a mosquito pathogen. *The New England Journal of Medicine*, 2004; 351: 42–47.
42. Harcourt-Brown FM, Holloway HK. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Veterinary Record*. 2003; 152: 427–431.
43. Miró-Corrales G, Cordero-del-Campillo M. Toxoplasmosis. Neosporosis. Encefalitozoonosis. In: Cordero-del-Campillo M, Rojo-Vásquez FA, coordinadores. *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.1999; 665-671.
44. Didier ES, Visvesvara GS, Baker MD, *et al.* A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34: 2835-2837.
45. Furuya K. Genotyping of *Encephalitozoon cuniculi* isolates found in Hokkaido. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2002; 55:128-130.
46. Snowden K, Logan K, Didier ES. *Encephalitozoon cuniculi* Strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *Journal of Infectious Disease* .1999; 180:2086-2088.
47. Sobottka I, Iglauer F, Schüller T, *et al.* Acute and long term humoral immunity following immunization of rabbits with inactivated spores of various *Encephalitozoon* species. *Parasitology Research*. 2001; 87: 1-6.
48. Méténier G, Vivavré CP. Molecular characteristics and physiology of Microsporidia. *Microbes and Infection*. 2001; 3: 407-415.
49. Kahler AM, Thurston-Enriquez JA. Human pathogenic microsporidia detection in agricultural samples: method development and assessment. *Parasitology Research*. 2007; 100: 529-538.

50. Reetz J, Karsten N, Reckinger S, *et al.* Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitology International*. 2009; 58 (3):285-92.
51. Xiao L, Li L, Moura H, *et al.* Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39: 2191–2196.
52. Hersteinsson P, Gunnarsson E, Hjartardottir S, *et al.* Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland. *Journal of Wildlife Diseases*, 1993; 29 (2): 341–344.
53. Lappin MR. Protozoal and miscellaneous infections. In: Ettinger SJ, Feldman EL. Textbook of veterinary internal medicine. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2000; 416.
54. Lobo M L, Teles A, Da Cunha MB, *et al.* Microsporidia detection in stools from pets and animals from the zoo in Portugal: a preliminary study. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2003; 50: 581–582.
55. Benz P, Maass G, Csokai J. Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in the feline cataractous lens. *Veterinary Ophthalmology*. 2011; 1: 37-47.
56. Shadduck JA, Bendele R, Robinson GT. Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Veterinary Pathology*. 1978; 15: 449–460.
57. Ashford RW, Snowden KF. Dogs and protozoan zoonoses. In: Macpherson CNL, Meslin FX, Wandeler AI. Dogs, Zoonoses and Public Health. Wallingford: CABI Publishing. 2000; 142-144.
58. Nordstoga K, Westbye K. Polyarteritis nodosa associated with toxoplasmosis in blue foxes. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1976; 84: 291-296.
59. Botha W S, Van Dellen AF, Stewart CG. Canine encephalitozoonosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 1979; 50: 135–144.
60. Åkerstedt J. Serological investigation of canine encephalitozoonosis in Norway. *Parasitology Research*. 2003; 89: 49-52.

61. Halánová M, Letková V, Macák V, *et al.* The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Veterinary Parasitology*, 1999; 31: 82(2): 167- 171.
62. Khanna RS, Iyer PKR. A case of *Nosema cuniculi* infection in a goat. *Indian Journal of Medical Research*. 1971; 59: 993–995.
63. Cisláková L, Literák I, Bálent P, *et al.* Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia) in angora goats--a potential risk of infection for breeders. *Annals of agricultural and environmental medicine*. 2001; 8(2): 289-291.
64. Van Rensburg IB, Volkmann DH, Soley JT, *et al.* *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1991; 62: 130–132.
65. Patterson-Kane JC, Caplazi P, Rurangirwa F, *et al.* *Encephalitozoon cuniculi* placentitis and abortion in a quarterhorse mare. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2003; 15: 57–59.
66. Shadduck JA, Baskin G. Serologic evidence of *Encephalitozoon cuniculi* infection in a colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Laboratory Animal Science*. 1989; 39 (4) : 328–330.
67. Zeman DH, Baskin G. Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Veterinary Pathology*. 1985; 22(1): 24–31.
68. Baskin G: *Encephalitozoon cuniculi* infection, squirrel monkey. In: *Nonhuman Primates II*, ed. Jones TC, Mohr U, and Hunt RD. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1993;193-196.
69. Didier ES, Varner PW, Didier PJ, *et al.* Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitologica*. 1994; 41 (1):1–11.
70. Van Dellen AF, Stewart CG, Botha WS. Studies of encephalitozoonosis in vervet monkeys (*Cercopithecus pygerythrus*) orally inoculated with spores of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from dogs (*Canis familiaris*). *The Onderstepoort Journal. Veterinary. Research*. 1989; 56:1–22.
71. Matsubayashi M, Koike T, Mikata I, *et al.* A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Archives.of Pathology*. 1959; 67(2): 181–187.

72. Mathis A, Michel M, Kuster H, *et al.* Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology*. 1997; 114: 29-35.
73. Halánová M, Čisláková L, Valenčáková A, *et al.* Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Annals Of Agricultural And Environmental Medicine*. 2003; 10: 117-120.
74. Black SS, Steinhart LA, Bertucci DC, Rogers LB, Didier ES. *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Pathology*. 1997; 34 (3):189–198.
75. Kemp RL, Kluge JP. *Encephalitozoon sp.* in the bluemasked lovebird, *Agapornis personata* (Reichenow): first confirmed report of microsporidian infection in birds. *Journal of Protozoology*. 1975; 22:489–491.
76. Norton JH, Prior HC. Microsporidiosis in a peach-faced lovebird (*Agapornis roseicollis*). *Australian Veterinary Journal*. 1994; 71: 23–24.
77. Pulparampil N, Grahm D, Phalen D, Snowden K. *Encephalitozoon hellem* in two eclectus parrots (*Eclectus roratus*): identification from archival tissues. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1998; 45 (6):651–655.
78. Weber R, Mathis A, Deplazes P. Intestinal and systemic infections due to microsporidia. *Internist*. 1996; 37 (9):912–918.
79. Méteniér G, Vivarès CP. Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes and Infection*. 2001; 3 (5): 407–415
80. Müller C. Untersuchungen zur Diagnostik. Biologie und Verbreitung von Microsporidien bei Kaninchen und anderen Tierarten. *Dissertation, University of Zürich*. 2008.
81. Vavra J, Larsson R. Structure of the microsporidia. In: Wittner, M., Weiss, L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. *American Society of Microbiology*, Washington, DC. 1999; 7–84.
82. Snowden KF, Didier ES, Orenstein JM, *et al.* Animal models of human microsporidial infections. *Laboratory Animal Science*. 1998; 48 (6): 589–592.
83. Didier ES, Snowden KF, Shadduck JA. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Advances in Parasitology*. 1998; 40: 283–320.
84. Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, *et al.* Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection*. 2000; 2(6): 709–720.

85. Shadduck JA., Orenstein JM.1993. Comparative pathology of microsporidiosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 1993; 117 (12):1215–1219.
86. Pakes SP, Shadduck JA, Cali A. Fine structure of *Encephalitozoon cuniculi* from rabbits, mice and hamsters. *The Journal of Protozoology*. 1975; 22 (4):481–488.
87. Dunn AM, Smith J. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes and Infection*. 2001; 3(5): 381-388.
88. Kotler DP, Orenstein JM. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Advances in parasitology*. 1998; 40: 321–349.
89. Kotler, D., Orenstein, J.M. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In:Wittner, M.,Weiss, L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis..* American Society of Microbiology, Washington, DC. 1999; 258–292.
90. Weber R, Deplazes P, Schwartz D. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contributions to Microbiology*. 2000; 6: 166–192.
91. Percy DH, Barthold SW. Pathology of laboratory rodents & rabbits. 2nd ed. Iowa, USA. Blackwell. 2001; 248-250, 288-292.
92. Herich R, Levkutová M, Kokinčáková T, *et al*. Diagnosis and manifestation of encephalitozoonosis in mice after experimental infection with different species and application of dexamethasone. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*. 2006; 53(7): 340-345.
93. Csokai J, Gruber A, Künzel F, *et al*. Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitology Research*. 2009; 104 (3):629-635.
94. Pattison M, Clegg FG, DUNCAN AL. An outbreak of encephalomyelitis in broiler rabbits caused by *Nosema cuniculi*. *Veterinary Record*. 1971; 10: 88(15), 404-405.
95. Percy D, Barthold S. Rabbit. Parasitic diseases. In *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*. Ames, Iowa State University Press.1993,pp 210-217 1 ed

96. Okewole EA. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in Nigeria. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2008; 75(1):33-38.
97. Harkness JE, Wagner JE. The biology and medicine of rabbits and rodents. 4th ed. Media: Williams & Wilkins. 1995;204-206.
98. Snowden KF, Shadduck JA. Microsporidia of higher vertebrates. In: Wittner, M., Weiss, L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC.1999; 393–419.
99. Harcourt-Brown FM. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2004; 13: 86-93.
100. Meyer-Breckwoldt A. Epidemiologische und klinische Untersuchungen zur Encephalitozoonose beim Zwergkaninchen. Dissertation, Veterinary University, Hannover. 1996
101. Kunstýř I, Naumann S. Head tilt in rabbits caused by pasteurellosis and encephalitozoonosis. *Laboratory Animals*. 1985; 19(3):208–213
102. Jass A, Matiassek K, Henke J, *et al.* Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *Veterinary Record*. 2008; 162(19):618–622.
103. Künzel F, Gruber A, Tichy A, *et al.* Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*. 2008; 151(2-4): 115-124.
104. Ewringmann A, Göbel T. Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Encephalitozoonose beim Heimtierkaninchen. *Kleintierpraxis*.1999; 44:357–372.
105. Paul-Murphy J. Reproductive and urogenital disorders. In: Hilleyer EV, Quesenberry KE ed. *Ferrets, rabbits and rodents – clinical medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders; 1997; 207-210.
106. Robinson JJ.Common infectious disease of laboratory rabbits questionably attributed to *Encephalitozoon cuniculi*. *Archives of Pathology*. 1954; 58(1):71–84.
107. Reusch B. Urogenital system and disorders. In: Meredith A, Flecknell P, eds. *BSAVA manual of rabbit medicine and surgery*. 2nd ed. Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association.2006; 86-88.

108. Melillo A. Rabbit clinical pathology. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2007; 16:135-145.
109. Grahn B, Wolfer J, Keller Ch. Diagnostic Ophtalmology. *Canadian Veterinary Journal*. 1991; 32: 372–373.
110. Wolfer J, Grahn B, Wilcock B. Phacoclastic uveitis in the rabbit. *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology*. 1993; 3: 92-97.
111. Peiffer RL, Pohm-Thorsen I, Corcoran K. Models in ophthalmology and vision research. In :The Biology of the Laboratory Rabbit. 2nd edn. Eds P. J. Manning, D. H. Ringler, C. E. Newcomer. San Diego, Academic Press. 1994; 410-434
112. Giordano C, Weigt A, Vercelli A, *et al*. Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. *Veterinary Ophthalmology*. 2005; 8(4): 271–275.
113. Fechle LM, Sigler RL. Phacoemulsification for the management of *Encephalitozoonon cuniculi*-induced phacoclastic uveitis in a rabbit. *Veterinary Ophthalmology*. 2002; 5(3):211–215.
114. Wagner F, Fehr M. Common ophthalmic problems in pet rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2007; 16:158-167.
115. Csokai J, Joachim A, Gruber A, *et al*. Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*. (2009a) 163(1–2):18–26.
116. Lyngset A . A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. *Laboratory Animal Science*. 1980; 30 (3): 558–561.
117. Boot R, Hansen C, Nozari N, Thuis H. Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals*. 2000; 34(3):281–289.
118. Cox JC, Gallichio HA. Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. *Research in Veterinary Science*. 1978; 24(2): 260–261.
119. Bywater JE, Kellett, BS. The eradication of *Encephalitozoon cuniculi* from a specific pathogen-free rabbit colony. *Laboratory Animal Science*. 1978; 28(4): 402–404.

120. Cox JC, Hamilton RC, Attwood HD. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *The Journal of Protozoology*. 1979; 26 (2): 260–265.
121. Waller T, Morein B, Fabiansson E. Humoral immune response to infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals*. 1978; 12 (3):145–148.
122. Scharmann W, Reblin L, Griem W. Untersuchungen über die Infektion von Kaninchen durch *Encephalitozoon cuniculi*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1986; 99:20–24.
123. Boot R, Hansen C, Nozari N, et al. Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals*. 2000; 34(3):281–289.
124. Suter C, Müller-Doblies UU, Hatt J-M, Deplazes P. Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits with fenbendazole. *Veterinary Record*. 2001; 148:478 -480.
125. Cray C, Arsia G, Schneider R, et al. Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *American Journal of Veterinary Research*. 2009; 70 (4): 478-482.
126. Fenoy S, Pérez-Fernández AA, Rodero M, et al. *Encephalitozoon cuniculi*: implementation of a new fluorimetric method for the detection of anti-microsporidia antibodies. *Experimental Parasitology*. 2010; 126(2): 267-269.
127. Pakes SP, Shadduck JA, Olsen RG. A diagnostic skin test for encephalitozoonosis (nosematosis) in rabbits. *Laboratory Animal Science*. 1972; 22: 870-877.
128. Gannon J. The immunoperoxidase test diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals*. 1978; 12(3): 125-127.
129. Weber R, Schwartz DA, Deplazes P. Laboratory diagnosis of microsporidiosis. In: Wittner, M., Weiss, L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC 1999; 315–362.
130. Garcia LS. Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40 (6): 1892–1901.

131. Didier E, Orenstein JM, Aldras A, *et al.* Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33 (12):3138-3145.
132. Didier ES, Vossbrinck CR, Baker MD, *et al.* Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*. 1995 b; 111 (Pt 4):411–421.
133. Künzel F, Gruber A, Tichy A, *et al.* Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*. 2008; 151 (2-4): 115–124.
134. Baneux PJ, Pognan F. In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Laboratory Animals*. 2003; 37(2):132–138.
135. Valencakova A, Balent P, Petrovova E, *et al.* Encephalitozoonosis in household pet Nederland dwarf rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Parasitology*. 2008; 153 (3-4):265-269.
136. Wicher V, Baughn RE, Fuentealba C, *et al.* Enteric infection with an obligate intracellular parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in an experimental model. *Infection and Immunity*. 1991; 59 (7): 2225–2231.
137. Eröksüz Y, Eröksüz H, Özer H, *et al.* A survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbit colonies in Elazığ, Turkey: pathomorphologic and serologic (carbonimmunoassay test) studies. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 1999; 54 (3):73–77.
138. Gentz EJ, Carpenter JW. Neurologic and musculoskeletal disease. In: Hilleyer EV, Quesenberry KE. *Ferrets, rabbits and rodents – clinical medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders. 1997;220-223.
139. Nast R, Middleton DM, Wheler CL .Generalized encephalitozoonosis in a Jersey wooly rabbit. *Canadian Veterinary Journal*. 1996; 37 (5): 303–305.
140. Hinton M. Kidney disease in the rabbit: a histological survey. *Laboratory Animals*. 1981; 15:263-265.
141. Harkness JE, Wagner JE. *The biology and medicine of rabbits and rodents*. 4th ed. Media: Williams & Wilkins.1995; 204-206.
142. Flatt RE, Jackson SJ. Renal nosematosis in young rabbits. *Pathologia Veterinaria*. 1970; 7 (6): 492–497.

143. Dubielzig RR, Ketrings K, Mclellan GJ *et al.* Veterinary Ocular Pathology: a comparative review. London: Saunders Elsevier, 2010; 10:335-338.
144. Donnelly TM. *Encephalitozoon cuniculi*-associated phacoclastic uveitis in the rabbit: a Review. *Journal Exotic Mammal Medicine Surgery*. 2003; 1:1-3.
145. Dubey JP, Brown CA, Carpenter JL, *et al.* Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. *Veterinary Parasitology*. 1992; 44: 305–309.
146. Leland MM, Hubbard GV, Dubey JP. Clinical toxoplasmosis in domestic rabbits. *Laboratory Animal Science*. 1992; 42 (3): 318–319.
147. Snyder SB, Fox JG, Soave OA. Sub-clinical otitis media associated with *Pasteurella multocida* infections in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Laboratory Animal Science*. 1973; 23(2): 270–272.
148. Gruber A, Pakozdy A, Weissenböck H, *et al.* A retrospective study of neurological disease in 118 rabbits. *Journal of Comparative Pathology*. 2009; 140(1): 31–37.
149. Murray KA, Hobbs BA, Griffith JW. Acute meningoencephalomyelitis in a rabbit infected with *Pasteurella multocida*. *Laboratory Animal Science*. 1985; 35(2):169–171.
150. Weissenböck H, Hainfellner JA, Berger J, *et al.* Naturally occurring herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Pathology*. 1997; 34(1):44–47.
151. Grest P, Albicker P, Hoelzle L, *et al.* Herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Comparative Pathology*. 2002; 126(4):308–311.
152. Müller K, Fuchs W, Heblinski W, *et al.* Encephalitis in a rabbit caused by human Herpes virus-1. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2009; 235(1): 66–69.
153. Williams DL. Laboratory Animal Ophthalmology. In: Gelatt KN (ed) *Veterinary Ophthalmology*, 3rd edn. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 1999; 1209–1236
154. Deeb BJ, Carpenter JW. Neurologic and musculoskeletal disease. In: Quesenberry KE, Carpenter JW (eds) *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*, 2nd edn. Saunders, St. Louis, 2004 ; 203–210.

155. Waller T. Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Laboratory Animals*. 1979; 13: 227–230.
156. Shadduck JA . Effect of fumagillin on in vitro multiplication of *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Protozoology*. 1980; 27(2):202–208.
157. Beauvais B, Sarfati C, Challier S, et al. In vitro model to asses effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38(10): 2440–2448.
158. Franssen FF, Lumeij JT, Van Knapen F. Susceptibility of *Encephalitozoon cuniculi* to several drugs in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995; 39(6):1265–1268.
159. Neuschl J, Čonkova E, Krokavec P, et al. The development of encephalitozoonosis in rabbits after infection by *Encephalitozoon cuniculi* and treatment with albendazole. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 1999; 49 (4):327–334.
160. Williams DL. Ophthalmology. In: Meredith A, Flecknell P, eds. BSAVA manual of rabbit medicine and surgery. 2nd ed. Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association, 2006; 124-126.
161. Künzel F, Joachim A. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology Research*. 2010; 106(2):299-309. Epub 2009 Nov 17.
162. Stiles J, Didier E, Ritchie B, et al. *Encephalitozoon cuniculi* in the lens of a rabbit with phacoclastic uveitis: confirmation and treatment. *Veterinary e Comparative Ophthalmology*. 1997; 7: 233–238.
163. Contreas CN, Berlin OG., Ash LR, et al. Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000; 63(3-4): 121–127.
164. Chan CM, Theng JT, Li L, et al. 2003. Microsporidial keratoconjunctivitis in healthy individuals: a case series. *Ophthalmology*. 2003, 110 (7): 1420–1425.
165. Molina JM, Tourneur M, Sarfati C, et al. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346 (25): 1963–1969.
166. Didier, E.S., 1997. Effects of albendazole, fumagillin, and TNP-470 on microsporidial replication in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997; 41: 1541–1546.

167. Coyle C, Kent M, Tanowitz HB, *et al.* TNP-470 is an effective antimicrosporidial agent. *Journal of Infectious Disease*. 1998 ; 177(2): 515–518.
168. Costa SF, Weiss LM. Drug treatment of microsporidiosis. *Drug Resistance Updates*. 2000; 3(6):384-399.
169. Cox JC, Gallichio HA, Pye D, *et al.* Application of immunofluorescence to the establishment of an *Encephalitozoon cuniculi*-free rabbit colony. *Laboratory Animal Science*. 1977; 27(2): 204-209.
170. Jordan CN, DiCristina JA, Lindsay DS. Activity of bleach, ethanol and two commercial disinfectants against spores of *Encephalitozoon cuniculi*. *Veterinary Parasitology*. 2006b; 136(3-4):343-346.
171. Gerba CP, Riley KR, Nwachuku N, *et al.* Removal of *Encephalitozoon intestinalis*, calicivirus, and coliphages by conventional drinking water treatment. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*. 2003; 38 (7): 1259–1268.
172. Khalifa, AM, El Tamsahy MM, Abou El Naga IF. Effect of ozone on the viability of some protozoa in drinking water. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2001; 31(2): 603–616.
173. Li X, Trout JM, Jenkins MC, *et al.* Effects of gamma radiation on viability of *Encephalitozoon* spores. *Journal of Parasitology*. 2002; 88(4):812–813.
174. John DE, Nwachuku N, Pepper IL, *et al.* Development and optimization of a quantitative cell culture infectivity assay for the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis* and application to ultraviolet light inactivation. *Journal of Microbiological. Methods*. 2003; 52 (2):183–196.
175. Johnson CH, Marshall MM, DeMaria LA, *et al.* 2003. Chlorine inactivation of spores of *Encephalitozoon* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69 (2): 1325–1326.
176. Marshall MM, Hayes S, Moffett J, *et al.* Comparison of UV inactivation of spores of three *Encephalitozoon* species with that of spores of two DNA repair-deficient *Bacillus subtilis* biosimetry strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69 (1): 683–685.

4. CAPITULO 2 - SOROPREVALÊNCIA DO *Encephalitozoon cuniculi*, EM COELHOS NO BRASIL

4.1 RESUMO

Encephalitozoon cuniculi é um protozoário intracelular obrigatório, oportunista, pertencente à classe Microsporea. Trata-se do organismo responsável pela encefalitozoonose, uma zoonose que acomete principalmente os coelhos, podendo também afetar outras espécies de animais e os seres humanos. As principais alterações observadas ocorrem no sistema nervoso, renal, hepático e ocular. O diagnóstico presuntivo é obtido pela sorologia e o definitivo pela histopatologia. Os objetivos da investigação foram determinar a soroprevalência do *E. cuniculi* na região de Curitiba – Paraná, e de outros estados do Brasil, em coelhos clinicamente normais e em coelhos apresentado alterações oftálmicas ou do sistema nervoso central, caracterizando retrospectivamente as principais lesões oftálmicas e nervosas encontradas nos casos positivos. Métodos: Foi investigada a presença de anticorpos contra *E.cuniculi* por meio do teste sorológico (ELISA) em amostras de 187 coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) de diferentes idades, sexo e raças. Todos os animais foram submetidos ao exame clínico neurológico, oftalmológico e posterior coleta de sangue, sendo as amostras submetidas. Para análise estatística empregou-se o Teste Exato de Fisher. Foram encontrados anticorpos contra *E.cuniculi* em 152 dos 187 coelhos pesquisados. Não houve diferença significativa, entre as regiões estudadas, sexo, idade, raça, cor com relação à soropositividade do microsporídeo. No entanto, os animais que não

apresentaram sinais neurológicos e oftálmicos foram significativamente mais soropositivos do que aqueles que apresentaram tais sinais clínicos.

Os resultados reforçam a hipótese de que o coelho pode ser indicado como o principal reservatório de *E. cuniculi*. Portanto, considerando o potencial zoonótico do parasito, evidencia-se a importância e necessidade da realização de exames de rotina em coelhos domésticos.

Palavras-chave: *E. cuniculi*, coelho, amostras, zoonose, anticorpos, protozoário.

4.2 ABSTRACT

Encephalitozoon cuniculi is an obligate intracellular protozoan, opportunistic, belonging to the class Microsporea. This is the agent responsible for encephalitozoonosis, a zoonosis that primarily affects rabbits, but can also affect other species of animals and humans. The main alterations occur in the nervous system, kidney, liver and eyes. The presumptive diagnosis is obtained by serology and by final histopathology. The research objectives were to determine the seroprevalence of *E. cuniculi* in the region of Curitiba - Paraná, and other states of Brazil, in clinically normal rabbits and rabbits presenting ophthalmic or nervous alterations, characterizing retrospectively the main nervous and ophthalmic lesions found in positive cases. Methods: We investigated the presence of antibodies against *E. cuniculi* through serological test (ELISA) in samples of 187 domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of different ages, gender and races. All animals passed through a clinical

neurological and ophthalmic, and subsequent blood collection for serology. For statistical analysis we used the Fisher exact test. *E.cuniculi* antibodies were found in 152 of 187 rabbits studied. There was no significant difference between the regions studied, sex, age, race, color with respect to seropositivity microsporídeo. However, animals that had no neurological and ophthalmic signs were significantly more seropositive than those who presented the clinical signs.

The results reinforce the hypothesis that the rabbit can be indicated as the main reservoir of *E. cuniculi*. Therefore, considering the zoonotic potential of the parasite, highlights the importance and necessity of carrying out routine tests on domestic rabbits.

Key-words: *E. cuniculi*, rabbit, samples, zoonosis, antibodies, protozoan.

4.3 INTRODUÇÃO

Encephalitozoon cuniculi é um protozoário cosmopolita do tipo microsporídeo e pertencente ao filo Microspora. Esses protozoários são considerados primitivos, pois não possuem mitocôndrias, são agentes intracelulares obrigatórios^{1, 2} e também é considerado um organismo do tipo patogênico oportunista^{3, 4}. Pode causar uma doença denominada encefalitozoonose que afeta coelhos, mas tem sido diagnosticada em ovinos, caprinos, suínos, felinos, raposas, eqüinos, peixes, roedores, insetos, primatas não humanos e seres humanos⁵, roedores, cães domésticos e outros canídeos⁶.

A fonte de transmissão para os seres humanos ainda não está bem elucidada, mas acredita-se que coelhos e cães sirvam de reservatórios. Pesquisadores demonstraram que cepas que infectaram pessoas são similares às cepas infectantes para cães, reforçando a suspeita da possível transmissão direta dos animais para os seres humanos⁷.

A infecção em seres humanos pode ser desde assintomática à sintomática grave, de caráter agudo ou crônico, podendo ocorrer morte súbita em muitos casos^{6, 8}. Nos coelhos a doença se expressa de forma assintomática ou pode apresentar sinais clínicos típicos de lesão do sistema nervoso, como síndrome vestibular, paresia de membros pélvicos. A inclinação de cabeça (*head tilt*) apresenta-se como principal sinal neurológico nesses casos^{2, 8}. A doença ainda pode causar problemas renais. Por fim, o bulbo ocular é particularmente afetado por este agente, causando tipicamente uveíte, glaucoma secundário e catarata^{2, 8}. Em seres humanos, a encefalitozoonose é uma doença de caráter emergente⁴, e são responsáveis por diferentes distúrbios clínicos como diarreia, sinusite, pneumonia, miosite, lesão cerebral, ceratite e infecções sistêmicas, sendo que os aspectos patogênicos da doença variam principalmente de acordo com a competência imunológica do hospedeiro^{3, 4}.

O diagnóstico presuntivo é baseado nos sinais clínicos associado ao exame sorológico, sendo o último realizado por meio da titulação de anticorpos séricos por ELISA indireto e imunofluorescência indireta², ou pelo teste de soroaglutinação direta⁹.

O diagnóstico definitivo *antemortem* pode ser comprometido pela dificuldade em isolar o agente transmissor da doença, sendo o exame histopatológico necessário para detecção e isolamento do mesmo, pois a sorologia apenas confirma o contato com o agente, mas não dá o diagnóstico definitivo da doença. Já no *posmortem* o exame histopatológico pode evidenciar o agente geralmente com áreas granulomatosas no rim, no bulbo ocular e no cérebro².

O tratamento visa reduzir a inflamação e evitar a formação de esporos. Instalados os sinais neurológicos é improvável haver cura completa. Uma vez que os sinais clínicos podem estar associados a infecções bacterianas secundárias, a antibioticoterapia deve ser realizada sempre que possível¹⁰.

A profilaxia tem como objetivo manter altos os padrões de higiene no plantel. Sendo assim, devem ser implementadas medidas de controle sanitárias eficazes, como limpeza das gaiolas com a maior frequência possível e evitando-se o contato da urina com a água e comida^{8, 11}.

A prevalência de *E. cuniculi* em coelhos domésticos no município de Curitiba-PR, no estado de São Paulo, Santa Catarina e Rio de Janeiro é ainda desconhecida. Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar a soroprevalência do parasita nessas regiões a partir de coelhos que apresentaram ou não doenças oftálmicas.

Este foi o primeiro trabalho de prevalência de encefalitozoonose em coelhos no Brasil e também o primeiro a tentar caracterizar e compreender melhor sua relação com lesões oftálmicas que são comuns nesta doença.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 187 coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*), sendo 157 da Região de Curitiba-PR, atendidos pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná – Curitiba-PR, além de animais selecionados aleatoriamente em criadouros comerciais e da fazenda Bocaiúva, situada na cidade de Bocaiúva-PR, Distrito de Antinho e da Fazenda Canguri- UFPR/PR, 11 do estado de São Paulo provenientes da Escola Técnica de Presidente Prudente, 10 provenientes do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense - Campus Araquari, 8 animais do ZooPomerode (Fundação Hermann Weege) do estado de Santa Catarina e 1 proveniente do estado do Rio de Janeiro de um Consultório Veterinário particular. Dos 187 animais selecionados, 102 eram fêmeas, 85 eram machos. Com idades entre 2,5 meses a 2 anos, pesando entre 0,6 a 4, 4 kg, tendo diferentes raças e cores.

Para o estudo soroepidemiológico os coelhos foram divididos em 2 grupos: G1: coelhos saudáveis, sem sinais de doença aparente durante a anamnese, G2: coelhos com sinais neurológicos e oftálmicos.

Foi realizada, anamnese de todos os animais, incluindo comportamento, alimentação e estado de saúde. Posteriormente os animais foram submetidos a exame físico, neurológico e oftálmico. Durante o exame físico foram anotadas as seguintes informações na ficha clínica: temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória, palpação de linfonodos, e avaliação odontológica. O

exame oftálmico incluiu a avaliação da acuidade visual por meio de testes com bolas de algodão, testes de labirinto e a resposta reflexa à ameaça. Também foram avaliadas a produção lacrimal pelo Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)^a, a microbiota bacteriana foi estudada por meio de coleta e posterior cultura e antibiograma utilizando zaragatoa (*swab* com meio de transporte de Stuart), a sensibilidade da córnea pelo estesiometro^b, avaliação da córnea e câmara anterior e lente pela biomicroscopia com lâmpada de fenda^c, a pressão intraocular (PIO) por meio da tonometria digital de aplanção^d, e para inspeção da retina realizou-se fundoscopia indireta e direta e por fim a prova da fluoresceína^e foi utilizada para avaliar possíveis lesões na córnea.

Foi realizada tosa (quando necessária) e antissepsia da região do pescoço. Foram empregadas agulhas (24G) e seringas estéreis. Para a venopunção da veia jugular. Foram então coletados 5 mL de sangue de cada animal, totalizando 187 amostras, para avaliações hematológica (Hemograma e contagem de plaquetas, bioquímica ALT, GGT, FA, uréia e creatinina) e sorológica. Foram enviados 1 mL de sangue para obtenção dos hemogramas de 116 amostras e 2 mL de sangue obtenção do bioquímico de 80 amostras. O sangue foi acondicionado em um tubo de ensaio com anticoagulante (EDTA

^aTeste Lacrimal de Schirmer, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

^b *Cochet-Bonnet (Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, France)*

^c Biomicroscopio com lâmpada de fenda (*Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, France*).

^d Tonopen XL, Mentor Medical Systems.

^e Fluoresceína tiras, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

10%), e em outro sem anticoagulante para a obtenção do soro, respectivamente.

Para a avaliação sorológica empregou-se o Teste de ELISA. Para tanto, 2 mL de soro das 187 amostras foram congelados (4°C) e enviados para Universidade de Miami na Flórida, EUA (Escola de Medicina, Laboratório de Patologia Comparada), no qual foi pesquisado no soro, anticorpos para a doença em questão. Para realização do teste, foram utilizadas placas de Elisa disponíveis comercialmente^f. Essas placas foram revestidas com cepas de *E.cuniculi*^g de coelhos que haviam sido cultivadas em MRC-5 fibroblastos de pulmão humano. O antígeno foi extraído via tratamento SDS (dodecil sulfato de sódio), aquecido e centrifugado e ajustado a 3 µg/mL para revestimento da placa. A placa de Elisa utilizada possuía dois 2 poços / amostra: uma com antígeno do *E cuniculi* e a outra com um antígeno controle negativo (células de cultura de tecidos não infectados). As amostras de soro foram diluídas em série com PBS a partir de uma diluição de 1:32, sendo 50 µL de cada diluição adicionada em cada poço, e então incubadas a 37° C por 40 minutos. Após incubação essas placas foram lavadas com solução NaCl 0,9% e com solução de 0,05% Tween 20^h com o auxílio de uma lavadora de microplacasⁱ. Ainda nas amostras diluídas foram então adicionadas 50 µL de

^f ECUN ELISA plate, Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.

^g ATCC 50503, American Type Culture Collection, Manassas, Va.

^h Sigma Chemical Corp, St Louis, Mo.

ⁱ MultiWash Advantage microplate washer, TriContinent Inc, Grass Valley, Calif.

horseradish peroxidase conjugada anti-IgG^h de coelho e a placa foi incubada novamente por um período de 30 minutos. Após isso, as placas foram lavadas com solução de Tween e 50 µL de 2,2'-azino-bis (ácido-3-etilbeniltioazolina-6-sulfônico)^j foi adicionado. Dez minutos depois, com um leitor de microplacas^k o grau de absorvância de 405 nm foi medido. O índice foi calculado dividindo-se o grau de absorção do antígeno positivo assim como o do controle negativo também. Foi considerada positiva a amostras com índice de $\geq 1,5$.

A análise estatística utilizada foi o Teste Exato de Fisher para investigar diferenças entre as diferentes proporções de grupos de coelhos e suas características. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.5 RESULTADOS

Considerando o título de anticorpos >32 soropositivos e <32 soronegativos, das 187 amostras de sangue de coelhos, que foram submetidas à sorologia, 152 foram soropositivos (81,2%), e 35 foram soronegativos (18,7%), sendo que os soropositivos foram significativamente mais numerosos em relação aos soronegativos, em que ($P = 0,0001$).

^j Kirkegaard Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.

^k SpectraMax 340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.

Das 157 (83%) amostras coletadas do estado do Paraná 129 (82%) foram positivas e 28 (17,8%) foram negativas. Das 11 (5,8%) amostras coletadas do estado de São Paulo, 10 (90%) foram positivas e 1 (9%) foi negativa. Das amostras 18 (9,6%), coletadas do estado de Santa Catarina, 13 (72,2%) foram positivas e 5 (27,7%) foram negativas. E das amostras 1 (0,53%) coletadas do Rio de Janeiro 1 (100%) era negativa. Não houve diferença significativa para soropositividade entre esses estados.

Dos animais estudados no projeto, 102 eram fêmeas (54,54%) e 85 eram machos (45,45%). Das 102 fêmeas 82 (80,39%) foram positivas e 20 (19,23%) foram soronegativas, já nos machos, 70 (82,35%) foram soropositivos, e 15 (17,85%) foram soronegativos, sendo ($P= 0,91$), não havendo portanto diferença significativa quanto à soropositividade entre os sexos.

A idade dos 187 coelhos variou entre 2, 5 meses a 4 anos de idade. Sendo coelhos de 2,5 a 6 meses de idade (66,84%), coelhos de 6 meses a 2 anos (31,55%) e coelhos de 2 anos a 4 anos (1,60%). Não houve diferença significativa quanto à soropositividade entre as idades ($P= 0,85$).

Foram utilizados 75 (40%) coelhos da raça Nova Zelândia, 16 (8,5%) da raça Rex, 23 (12%) da raça Chinchila, 8 (4,2%) da raça Lion Head, 19 (10,1%) da raça Rex Borboleta, 16 (8,5%) da raça Black Rex, 6 (3,2%) da raça California, 3 (1,6%) da raça Gigante Alemão e 21 (11,2%) não foram identificadas as raças (Tabela 1). Com relação à pelagem, 75 (40%) eram brancos, 19 (10,1%) eram pretos, 20 (10,6%) eram branco - pretos, 10 (5,3%)

eram amarelos, 3 (1,5%) eram branco-amarelos, 24(12,8%) eram cinzas, 3 (1,6%) eram marrom - brancos, 2 (1,6%) eram marrons, 4(2,3%) eram cinza - brancos, 1 (0,53%) era preto – marrom, 1 (0,53%) era vermelho e 25 (13,3%) a cor não foi identificada (Tabela 2). Quanto à soropositividade entre raça e cor da pelagem não houve diferença significativa.

Tabela 1 - Porcentagem das raças de coelhos estudadas.

| Raças | Nº/Porcentagem |
|---------------|-----------------------|
| Nova Zelândia | 75 (40%) |
| Rex | 16 (8,5%) |
| Chinchila | 23 (12%) |
| Lion Head | 8 (4,2%) |
| Rex Borboleta | 19 (10,6%) |

Tabela 2- Porcentagem das cores das pelagens dos coelhos submetidos a avaliação sorológica.

| Cores dos coelhos | Nº/Porcentagem |
|--------------------------|-----------------------|
| Branco | 75 (40%) |
| Pretos | 19 (10,1%) |
| Branco-pretos | 20 (10,6%) |
| Amarelos | 10 (5,3%) |
| Branco-amarelos | 3 (1,5%) |
| Cinzas | 24 (12,83%) |
| Marrom-brancos | 3 (1,6%) |
| Marrons | 2 (1,6%) |
| Cinza-brancos | 4 (2,3%) |
| Preto-marrom | 1 (0,53%) |
| Vermelho | 1 (0,53%) |
| Raça não identificada | 25 (13,3%) |

A média e desvio padrão encontrados no exame da uréia foi de $34,66 \pm 12,24$ mg/dl para animais soronegativos $41,20 \pm 11,95$ mg/dl e para animais

soropositivos e para FA foi de $136,21 \pm 90,42$ U/L para animais soronegativos $191,40 \pm 105,06$ U/L para animais soropositivos. Não houve diferença significativa em relação à soropositividade de animais quanto às alterações encontradas nos exames hematológicos e bioquímicos, no entanto, os valores de P nas dosagens da uréia ($P=0,055$) e da FA ($P=0,06$) aproximaram-se da significância.

Dentre os animais que apresentaram sinais clínicos, 6 (37,5 %) apresentaram sinais neurológicos 2 (33,33%) eram soropositivos e 4 (66,66%) eram soronegativos, 5 (31,25%) apresentavam sinais oftálmicos 3 (60%) eram soropositivos e 2 (40%) eram soronegativos e 5 (31,25%), sendo 4 soropositivos (80%) e 1 (20%) soronegativo apresentavam sinais oftálmicos e neurológicos associados. Os animais que não apresentaram sinais neurológicos e oftálmicos eram significativamente mais soropositivos do que aqueles que apresentaram sinais neurológicos e oftálmicos ($P=0,0001$).

Os animais que não apresentaram sinais clínicos foram 171 (91%), sendo, significativamente em maior número do que aqueles que apresentaram sinais 16 (8,5%) ($P=0,0001$). Os soronegativos que apresentaram sinais clínicos 7(20%) foram significamente maiores ($P=0,002$) do que os soronegativos que não apresentaram sinais clínico 28 (80%) .

Os sinais neurológicos observados em nosso estudo e possivelmente atribuíveis a uma infecção ativa pelo *E. cuniculi* foram incontinência urinária, paralisia de membros posteriores (Figura 7 A), inclinação da cabeça (Figura 7 B).



Figura 7- Imagens de coelhos de diferentes raças apresentando sinais clínicos neurológicos causados pelo *Encephalitozoon cuniculi* A- Coelhos apresentando paralisia de membros pélvicos B- Coelhos apresentando sinais de síndrome vestibular, inclinação da cabeça (Torcicolo).

Os sinais oftálmicos possivelmente atribuíveis a uma infecção ativa pelo *E. cuniculi* foram catarata (Figura 8 A), uveíte, glaucoma (Figura 9 e Figura 10) e estrabismo, sendo esse sinal ainda não descrito em outras literaturas (Figura 11). Contudo, apesar dos animais apresentarem estas sintomatologias, não significa que eles apresentem mais predisposição a serem soropositivos comparativamente aos animais assintomáticos.

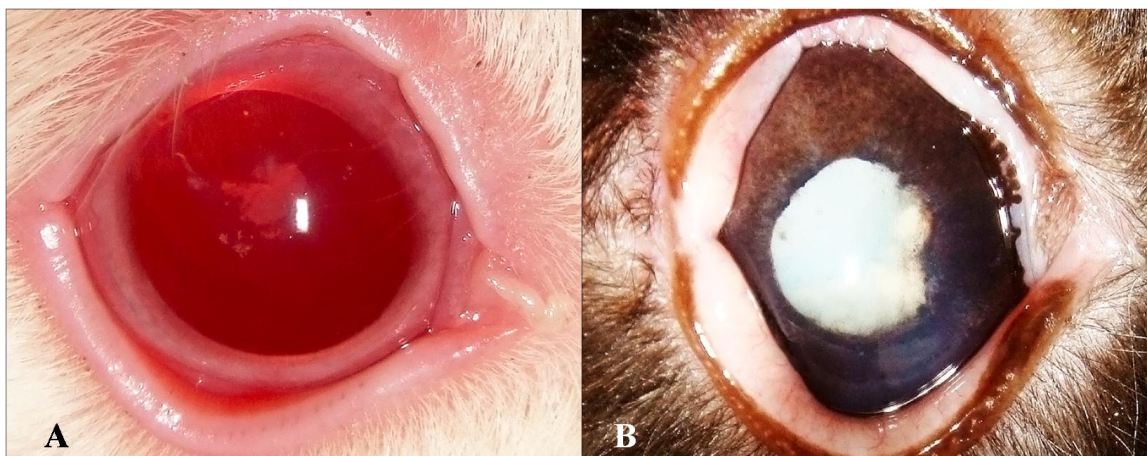


Figura 8 - Imagens de olhos de coelhos apresentando sinais clínicos oftálmicos
A- Catarata incipiente na cápsula posterior no olho direito B- Catarata madura no olho direito, sinéquia posterior 360° com seclusão pupilar e uveíte.

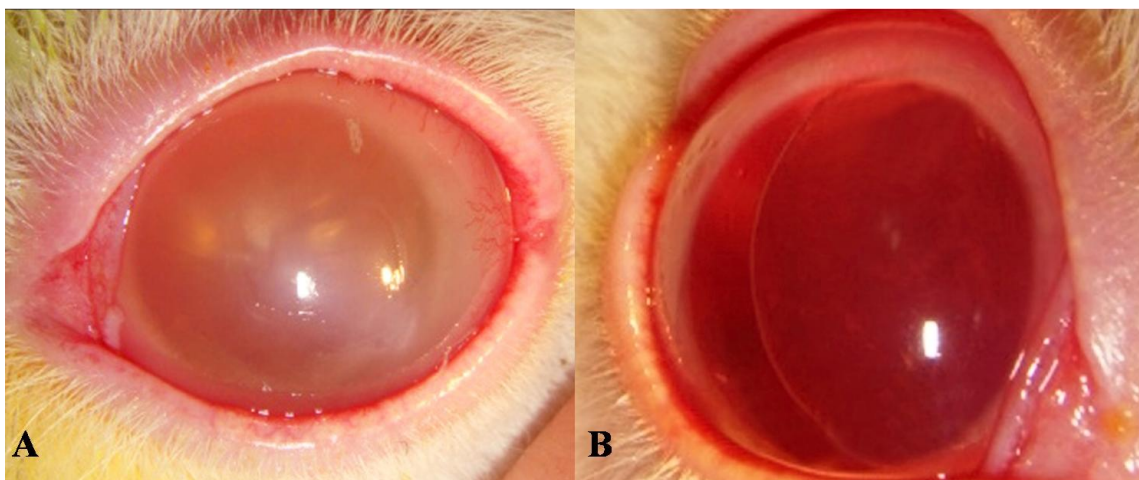


Figura 9 - Imagens de olhos de coelhos apresentando sinais clínicos oftálmicos
A- Pupila irregular em decorrência de uveíte reflexa, causada por úlcera de córnea mecânica por abrasão da córnea no chão devido à inclinação da cabeça B- Luxação posterior do cristalino causado por glaucoma associado à uveíte.

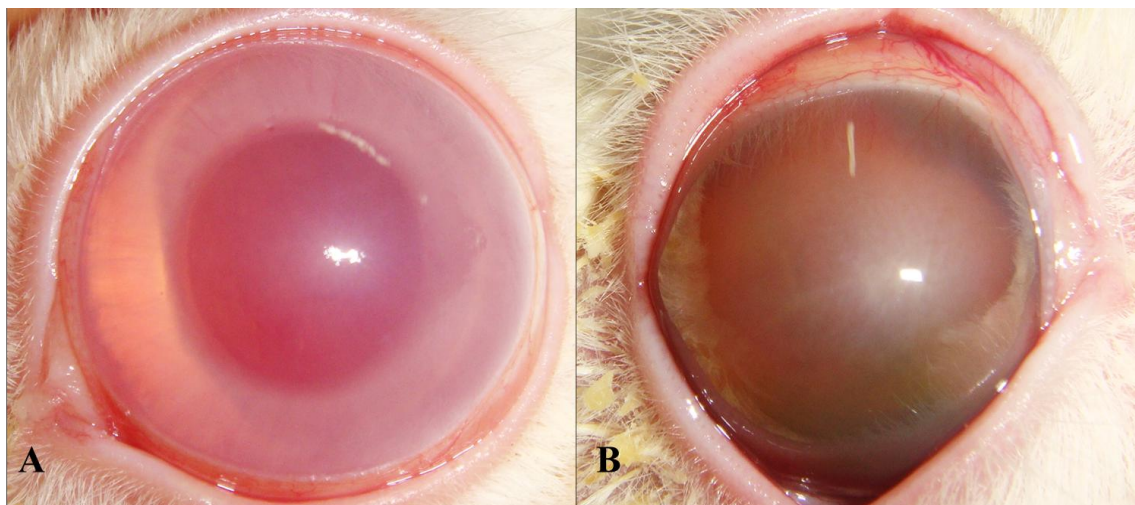


Figura 10 - Imagens de sinais clínicos oftálmicos em olhos de coelhos A- Bulbo ocular esquerdo bupftálmico, com midríase parcial caracterizando quadro de glaucoma associado à uveíte B- Hifema em câmara anterior do bulbo ocular direito e buphthalmia em um coelho positivo para *Encephalitozoon cuniculi*



Figura 11 - Imagem de estrabismo em olho de coelho infectado pelo *E. cuniculi*.

4.6 DISCUSSÃO

O microsporídeo *E. cuniculi* tem sido encontrado em uma variedade de espécies animais, incluindo o ser humano, mas é diagnosticado principalmente em coelhos, nos quais a infecção por este parasita pode causar grave doença^{12, 13}. Estudos^{8, 2} sugerem que o principal reservatório de *E. cuniculi* são os coelhos, no presente trabalho optou-se por realizar de maneira pioneira no Brasil uma investigação da soroprevalência do protozoário, correlacionando os resultados da soroprevalência com eventuais sinais neurológicos e oftálmicos em coelhos. Deste modo, outras espécies animais, bem como os seres humanos, não foram estudados no Brasil, sendo esta pesquisa uma continuação lógica deste estudo no futuro.

Tem-se notado recentemente aumento nos números de relatos de casos de infecção por *E. cuniculi* nos coelhos^{14, 13}. O *E. cuniculi* foi considerado por muitos anos, como a causa clínica de doenças em animais de laboratório, mas só recentemente foi relatado como problema clínico em coelhos de estimação¹⁵. Em decorrência disso, no presente estudo coletamos também, os dados dos animais que foram encaminhados ao Hospital Veterinário (HV) da UFPR, por estes serem animais de estimação, e as outras amostras coletadas nos criadouros eram de animais que teriam como objetivo a domesticação, alimentação ou venda para uso em laboratório, porém, não foi testada a diferença entre esses animais quanto a soroprevalência, sendo esse um estudo futuro. Além da importância do potencial zoonótico deste parasita, outro importante fator é que *E. cuniculi* é causa significativa de morbidade e mortalidade para coelhos de estimação e em criações⁸. Nas criações

estudadas nesta pesquisa, foi observada alta mortalidade dos animais, podendo esta ser conferida ao parasita *Encephalitozoon cuniculi*, ou a outras causas sistêmicas. Porém, não foi realizado um estudo histopatológico das carcaças, bem como, pesquisado outras possíveis causas desta alta taxa de mortalidade.

Com relação à soroprevalência do *E. cuniculi* em nível mundial, estudos foram realizados em alguns países como o Japão^{16, 17}, Itália⁸, Reino Unido^{15, 18} e mais recentemente no Taiwan¹⁹. No Brasil este tipo de estudo ainda não tinha sido realizado, o que, complementa o presente estudo já que foram observados 152 animais, ou seja, 81% de animais soropositivos. No Japão, a encefalitozoonose nos coelhos tem sido relatada como epidemias em criações^{16, 17}, e em casos esporádicos²⁰. Todavia, outro estudo², demonstrou uma alta soropositividade para *E. cuniculi* em coelhos de estimação (e não somente em animais com sinais clínicos, como também em coelhos saudáveis). Como também foi observado neste estudo, em que a prevalência relatada foi de 76,47 % de soropositivos sem sinais clínicos e 4,8% que apresentaram sinais clínicos dentre eles sinais neurológicos e oftálmicos. Portanto, pesquisadores sugeriram que o parasito está altamente distribuído e mais estudos são necessários, principalmente nos campos microbiológicos, histopatológicos e imunológicos².

Por sua vez, em um estudo de soroprevalência em mais de 125 coelhos na Itália, confirmaram que o principal reservatório de *E. cuniculi* são os coelhos, sendo isso um importante fator de relevância epidemiológica e de saúde pública, visto o reconhecimento da infectividade em seres humanos⁸.

Em um estudo feito em Taiwan¹⁹, demonstraram que houve uma diferença significativa quanto à soropositividade entre as regiões pesquisadas. Entretanto nosso estudo não apresentou essa diferença significativa, corroborando assim o estudo feito no Reino Unido¹⁸ que também não demonstraram diferença significativa, nas regiões estudadas.

Os resultados da presente pesquisa demonstraram que não houve diferença significativa entre sexo e estado de saúde dos animais com relação a soropositividade dos mesmo, corroborando outras pesquisas^{8, 18}. Com relação a idade dos animais, um estudo mais recente^{8,19} observou que coelhos adultos apresentaram uma soropositividade para *E. cuniculi* significativamente maior quando comparada a animais jovens, sugerindo que os anticorpos maternos transmitidos à ninhada apresentam ação que pode variar entre quatro²¹ a oito⁸ semanas de vida. Porém, pesquisas anteriores demonstraram que não houve diferenças entre idade e raça nos coelhos domésticos, estudados por eles¹⁸, corroborando nosso estudo já que comparações de raça e idade em relação à soropositividade da doença também não houve diferença significativa.

Apesar dos dados estatísticos observados em nosso estudo não apresentarem diferença significativa em relação a soropositividade de animais quanto as alterações encontradas nos exames hematológicos e bioquímicos, os valores de *P* nas dosagens da uréia ($P= 0,055$) e da FA ($P=0,06$) aproximaram-se da significância. Em estudo feito por¹⁵, avaliando os níveis de uréia (6-14 a 8-3 $\mu\text{mol/litro}$) e creatinina (44-2 a 229 $\mu\text{mol/litro}$) no sangue de dez animais soropositivos com sinais clínicos do sistema urinário (poliúria, polidipsia e incontinência), observaram que três deles, apresentaram níveis de

uréia e creatinina elevados. Já em nossa pesquisa a uréia mensurada apresentou-se levemente alterada (41 a 45 mg/dl), porém em níveis menores, do que os achados na pesquisa de ¹⁵, isso pode ser talvez explicado por diferenças de Kits utilizados em cada pesquisa para mensuração dessa enzima. Em contrapartida, não foram observados níveis de creatinina alterados, contudo esses animais não tinham sinais clínicos do sistema urinário aparente. Cox et al., (1979) afirmam que esta doença causa alterações renais e hepáticas importantes. Em nosso estudo, foi observado alterações importantes nos níveis de FA, para os animais soropositivos para a doença, principalmente nos coelhos que apresentaram titulação de 256. Já as outras enzimas hepáticas encontravam-se dentro dos padrões de normalidade para essa espécie. Portanto, avaliações hematológicas e bioquímicas demonstram ser importantes no estudo da encefalitozoonose, uma vez que estas avaliações não tem sido relatadas em outros estudos.

Os animais infectados podem ser assintomáticos ou podem demonstrar sinais clínicos típicos de doença neurológica e/ou oftálmica, apresentando-se de forma aguda ou crônica, e em muitos casos acarretando em morte súbita dos animais^{2, 6, 8}. Neste estudo, houve significância dos animais que não apresentaram sinais neurológicos e oftálmicos para os que apresentaram em relação à soropositividade da doença, discordando com autores que afirmaram um alto percentual de coelhos soropositivos com lesões oftálmicas e neurológicas, com os que não apresentaram esses sinais ⁸.

O alto percentual de coelhos saudáveis soropositivos demonstra a importância da realização de exame de triagem para detecção de anticorpos

anti-*E. cuniculi* em coelhos, especialmente nos casos em que os proprietários dos animais assintomáticos soropositivos representem maior grupo de risco (como idosos, crianças e pessoas acometidas por doenças imunossupressoras como a AIDS)⁸. Concordando com a nossa pesquisa, que observou a presença de um elevado percentual de coelhos soropositivos assintomáticos 76% (143/187 animais).

No presente estudo, coelhos soronegativos que apresentavam sinal clínico semelhantes aos observados na encefalitozoonose estavam em significativamente em maior número do que os coelhos soronegativos que não apresentaram sinais clínicos. Sendo assim, para os animais que demonstraram sinais clínicos sugestivos da doença, é indicado uma nova avaliação sorológica para *E. cuniculi* após quatro semanas, uma vez que pode ocorrer soroconversão da doença neste período⁸.

4.7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo realizado no Brasil, mostrou que o *E.cuniculi*, está presente em coelhos da região, representando um ponto de partida para estudos posteriores em outras regiões, tendo como objetivo estudar a dinâmica de transmissão deste protozoário, já que é considerado uma doença com potencial zoonótico.

4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Weber R, Bryan R, Schwartz D, *et al.* Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Review*. 1994; 7: 426-461.
- 2- Igarashi M, Oohashi E, Dautu G, *et al.* High Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Pet Rabbits in Japan. *Journal Veterinary Medical Science*. 2008; 70: 1301–1304.
- 3- Fournier S, Liguory O, Sarfati C, *et al.* Disseminated infection due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: case report and review. *HIV-Medicine*. 2000; 3: 155-161.
- 4- Lallo MA, Santos MJ, Bonda EF. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. *Revista Saúde Pública*. 2002; 36: 621-6.
- 5- Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18: 423–445.
- 6- Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, *et al.* Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infection*. 2000; 2: 709–720.
- 7- Mathis A, Michl M, Kuster H, *et al.* Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infections to rabbits. *Parasitology*. 1997; 114: 29-35.
- 8- Santaniello A, Dipineto L, Rinaldi L, *et al.* Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Research in Veterinary Science*. 2009; 87: 67-69.
- 9- Jordan NC, Zajac AM, Snowden KS, *et al.* Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Veterinary Parasitology*. 2006; 135: 235–240.

- 10-Keeble E. Nervous and musculoskeletal disorders. In: *Manual of Rabbit Medicine and Surgery BSAVA* 2nd edition (ed. Meredith A, Flecknell P.). British Small animal Veterinary Association:Quedgeley Gloucester, 2006;103-108.
- 11-Boucher S, Novaille L. Manuel pratique des maladies des lapins. France Agricole éd., Paris, 1996; 25.
- 12-Harcourt-Brown FM. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2004; 13: 86-93.
- 13-Kunzel F, Gruber A, Tichy A, *et al*. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*. 2008; 151: 115-124.
- 14-Dipineto L, Rinaldi L, Santaniello A, *et al*. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses and Public Health*. 2008; 55: 173-175.
- 15-Harcourt-Brown FM, Holloway HK. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Veterinary Record*. 2003; 152: 427–431.
- 16-Takano S, Kondoh Y, Asai T, *et al*. Encephalitozoonosis found in rabbits reared in Sorachi, Hokkaido. *Journal of Japanese Veterinary Medical Association*. 1993; 46: 143–146.
- 17-Fukui D, Bando G, Kosuge M, *et al*. Clinical and pathological study of encephalitozoonosis in a zoo rabbit colony. *Journal of Japan Veterinary Medicine Association*. 2003; 56: 464–469.
- 18-Keeble EJ, Shaw DJ. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 2006; 158: 539–544.

- 19-Tee KY, Kao JP, Chiu HY, *et al.* Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. *Veterinary Parasitology*. 2011; 183(1-2):68-71. Epub 2011 Jun 24.
- 20-Kugi G, Tamaguchi R, Uchida K. Two spontaneous cases of infection with *Encephalitozoon* in rabbits. *Journal Veterinary Medicine (Tokyo)*. 2000; 53: 376–378.
- 21- Lyngset A. A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. *Laboratory Animal Science*. 1980; 30: 558–561.
- 22-Cox JC, Hamilton RC, Attwood HD. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *Journal of protozoology*. 1979; 26:260–265.

5. CAPITULO 3 - O OLHO DO COELHO (*Oryctolagus cuniculus*): OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS, ACHADOS ECOBIOMÉTRICOS E VALORES DE REFERÊNCIA PARA TESTES SELECIONADOS DE DIAGNÓSTICO OFTÁLMICO.

5.1 RESUMO

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi realizar uma investigação observacional descritiva das características morfológicas relevantes do olho e órbita óssea de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), bem como realizar testes selecionados de diagnóstico oftálmico.

Material e Método: Para avaliação dos parâmetros oftálmicos, foram estudados 344 olhos de 172 coelhos. Foram realizadas observações morfológicas do bulbo ocular e anexos, além de parâmetros oftálmicos e testes específicos: teste lacrimal de *Schirmer* (TLS), cultura da microbiota bacteriana normal da conjuntiva, estesiometria (sensibilidade corneana), pressão intra-ocular (PIO), espessura central da córnea (ECC), mensurações ecobiométricas do bulbo ocular em modo-B, fissura palpebral e diâmetro corneano. Também foram realizadas observações morfológicas utilizando-se crânios macerados.

Resultados e Discussão: Os valores encontrados em parâmetros normais para os testes de diagnóstico oftálmico foram: TLS $6,31 \pm 3,19$ mm; Estesiometria $1,52 \pm 0,71$ cm; PIO: $17,39 \pm 3,2$ mmHg; ECC: $0,38 \pm 0,04$ mm; Profundidade da câmara anterior: $0,25 \pm 0,03$ cm; Diâmetro axial da lente: $0,62 \pm 0,06$ cm; Profundidade da câmara vítrea: $0,64 \pm 0,05$ cm; Comprimento axial

do bulbo ocular: $1,50 \pm 0,08$ cm; Comprimento da fenda palpebral: $19,34 \pm 2,12$ mm; Comprimento da córnea: $11,95 \pm 1,38$ mm. As bactérias mais frequentemente isoladas da conjuntiva foram *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) (38,7%), seguidos de *Micrococcus* sp. (12%) e *Difteroides* aeróbicos (12%). Os valores de referência e observações obtidas em coelhos nesta pesquisa poderão auxiliar outros médicos veterinários oftalmologistas no reconhecimento das características morfológicas oftálmicas peculiares de coelhos, permitindo assim um diagnóstico das doenças oculares mais preciso, neste animal que também é utilizado como modelo experimental para estudos oftalmológicos.

Palavras-chave: *Oryctolagus cuniculus*; morfologia, microbiota normal, paquímetria ultrassônica, pressão intra-ocular, estesiometria, ultrassonografia ocular.

5.2 ABSTRACT

Objective: The objective of this study was twofold: describe relevant morphologic features of the eye and bony orbit of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and perform diagnostic ophthalmic tests to create a reference index for the anatomical and physiological species, which leads to an important segment for scientific investigation of descriptive view. **Material and Methods:** For evaluation of ophthalmic parameters were evaluated 344 eyes of 172 rabbits. Morphological observations were made on the eye globe and adnexa. Selected ophthalmic tests were performed, including Schirmer tear test (STT),

culture of normal bacterial flora of the conjunctiva, esthesiometry, intraocular pressure (IOP), central corneal thickness (CTT), B-mode echobiometry, and palpebral fissure and corneal diameter. Morphologic observations were made using macerated skulls

Results and Discussion: Ophthalmic diagnostic tests found were: TLS: 6.31 ± 3.19 mm; esthesiometry: 1.52 ± 0.71 cm; IOP: 17.39 ± 3.21 mmHg; ECC: 0.38 ± 0.04 mm, anterior chamber depth: 0.25 ± 0.02 cm, axial length of the lens: 0.62 ± 0.06 cm, vitreous: 0.64 ± 0.05 cm, axial length of the eye: 1.50 ± 0.08 cm, palpebral diameter: 19.34 ± 2.12 mm corneal diameter: 11.95 ± 1.38 mm. The bacteria most frequently isolated from the conjunctiva *Staphylococcus* were coagulase negative (CNS) (38.7%), followed by *Micrococcus* sp. (12%) aerobic diphtheroids and (12%). Observations and reference values reported in rabbits in this study may help other veterinary ophthalmologists to recognize morphological ophthalmic peculiarities of the rabbits, allowing accurate diagnosis of ocular disorders, in this animal model which is also used in experimental ophthalmologic studies.

Key-words: *Oryctolagus cuniculus*; morphology, normal microbiota, ultrasonic pachymetry, intraocular pressure, esthesiometry, ultrasonography.

5.3 INTRODUÇÃO

O coelho pertence à classe Mammalia, ordem Lagomorpha, família Leporidae, gênero *Oryctolagus* e espécie *Oryctolagus cuniculus* ¹. São descendentes de coelhos selvagens da região oeste da Europa e noroeste da África, onde são frequentes as espécies *Oryctolagus* sp selvagens ². Em algumas regiões do mundo, os coelhos domésticos tornaram-se selvagens, particularmente na Austrália ^{3; 4}. São monogástricos, herbívoros, tímidos, geralmente calmos e raramente barulhentos. Cavam galerias no solo e possuem hábito noturno ou crepuscular ⁵. Seu nome de gênero se origina da raiz grega *Oryct*, que significa fuçar ou cavar, e *lagus* que significa voluptuoso ou depravado, o nome da espécie indica que esse animal, conhecido como um cavador com comportamento sexual voluptuoso vive dentro das tocas ⁶.

As variações de tamanho e forma da pelagem são derivadas de séculos de cruzamento e seleção, que constituem as muitas raças reconhecidas pelas diversas associações de criadores. A raça Nova Zelândia é bastante utilizada para a produção de carne e pesquisa, já as raças Rex e Angorá para a produção de pele e as raças menores, para pesquisa e como animais de estimação; sendo um bom exemplo o coelho anão (da raça Lion) ^{6, 7}.

Os coelhos vivem em média de 6 a 8 anos, pesam de 1 a 6 kg dependendo da raça ^{6, 8}. Os olhos são localizados lateralmente na cabeça e a córnea é extensa, permitindo grande campo visual, entretanto o mesmo não permite a visão da área logo abaixo da boca, percebendo o alimento para apreensão e seleção dos mesmos por meio de fímbrias localizadas na região ao redor do lábio ^{6, 5}. A terceira pálpebra é bem desenvolvida e é movimentada

por um músculo estriado transversal ⁶. Os coelhos com problema de visão podem mover a cabeça para ambos os lados, para cima e para baixo como se fossem focar, na tentativa de observar toda área ao seu redor, sendo esse comportamento de varredura observado quando o coelho é carregado no colo dentro de uma sala ⁹.

A medicina de animais de estimação não convencionais é de importância crescente na sociedade. Os coelhos são particularmente importantes pois, além de serem animais de laboratório também vem sendo utilizados como animais de companhia. Sendo assim a procura de serviços médico-veterinários por parte dos seus proprietários é cada vez mais freqüente, principalmente em busca de diagnóstico por problemas oftálmicos. Como forma de contribuir com a literatura, o presente estudo objetivou realizar observações nos olhos de coelhos. O enfoque da pesquisa foi caracterizar a morfologia ocular, incluindo descrições anatômicas do olho e da órbita ocular e estabelecer parâmetros oftálmicos normais para testes de diagnóstico, com o intuito de poder auxiliar outros médicos veterinários oftalmologistas no reconhecimento das características morfológicas oftálmicas peculiares de coelhos, permitindo assim um diagnóstico das doenças oculares mais preciso, neste animal que também é utilizado como modelo experimental para estudos oftalmológicos.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Preparo das peças

Para o desenvolvimento do estudo sobre a órbita óssea de coelhos, foi utilizada uma combinação de diferentes técnicas de maceração com água, no

intuito de evitar danos aos delicados ossos do crânio desta espécie. A sequência dos eventos incluiu os procedimentos de remoção da pele de cada cabeça, cozimento em água fervente, remoção de tecidos moles grosseiros, maceração em recipiente fechado, lavagem, clareamento com peróxido de hidrogênio, secagem e montagem.

Após a remoção da pele, as cabeças foram introduzidas em recipiente com água fervente e cozidas por 60 minutos. Em seguida, com auxílio de uma pinça de Adson–Brown, lâminas de bisturi e tesoura de íris, foi promovida a remoção mecânica do encéfalo, grande parte dos músculos e outros tecidos moles mais grosseiros; consecutivamente foi realizada remoção manual mais delicada de tecidos remanescentes. Após a realização desta etapa, as cabeças foram colocadas totalmente imersas em recipientes fechados repletos de água, sendo mantidas durante duas semanas para a remoção do restante dos tecidos moles. Para o clareamento dos ossos, os crânios macerados foram totalmente submersos em peróxido de hidrogênio 50% durante 24 horas. Após este período as peças foram lavadas em água destilada, secas ao ar e montadas; cola branca foi utilizada para fixar os dentes e ossos maiores como os ossos nasais, enquanto que o osso lacrimal, mais delicado não foi colado, apenas encaixado. Assim, a conformação óssea da órbita de cinco cabeças de coelhos adultos jovens foi estudada a olho desarmado, como também sob magnificação de duas a quatro vezes por meio de lupa estereoscópica; fotografias digitais foram realizadas do conjunto total dos ossos da cabeça, bem como de detalhes relativos à órbita.

5.4.2 Procedimentos oftálmicos em animais vivos

Neste estudo foram utilizados 172 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), de diferentes raças, dentre elas o Chinchila, Lion Head, Nova Zelândia, Rex Borboleta, Rex Preto, Rex Vermelho, Rex amarelo, Gigante Alemão e Rex (Tabela 3). Sendo 67 machos, 105 fêmeas, apresentando diferentes pesos, idades, pelagens e coloração de íris variáveis. Os animais foram selecionados aleatoriamente junto a Fazenda Bocaiúva, situada em Bocaiúva – PR, Distrito de Antinho e Fazenda Canguri- UFPR/PR. Todos os procedimentos que envolveram a utilização dos animais vivos foram conduzidos de acordo com as “Normas para uso de animais em pesquisas oftalmológicas” da ARVO (*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*).

Tabela 3- Porcentagem das raças de coelhos estudadas.

| Raças | Nº Coelhos | Porcentagem % |
|----------------|-------------------|----------------------|
| Nova Zelandia | 60 | 34,88 |
| Chinchilla | 30 | 17,44 |
| Rex Borboleta | 24 | 13,95 |
| Rex Preto | 22 | 12,79 |
| Rex Amarelo | 16 | 9,3 |
| California | 7 | 4,06 |
| Rex Vermelho | 5 | 2,9 |
| Gigante Alemão | 4 | 2,32 |
| Lion Head | 2 | 1,16 |
| Rex | 1 | 0,58 |
| SRD | 1 | 0,58 |
| Total | 172 | 100% |

Os animais foram encaminhados ao Hospital Veterinário da UFPR e neles realizados exame físico para exclusão de sinais de doença ocular e/ou sistêmica e avaliação hematológica de todos os pacientes. Os testes oftálmicos foram realizados por diferentes avaliadores, porém, para evitar uma discrepância entre os observadores, o mesmo avaliador que realizou determinado teste, sempre o fez durante a avaliação de todos os outros animais em cada ocasião.

5.4.3 Exames oftálmicos

Os animais foram submetidos ao exame oftálmico, que incluiu: Inspeção ocular, avaliação dos reflexos pupilares, teste Lacrimal de Schirmer (TLS)^a, coleta de material para cultura e análise bacteriológica, estesiometria^b, biomicroscopia com lâmpada de fenda (Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, France)^c, documentação fotográfica digital (Máquina fotográfica, Sony Cybershot, DSC-W80)^d, tonometria digital de aplanção^e, paquimetria central de córnea

^a Teste Lacrimal de Schirmer, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

^b *Cochet-Bonnet (Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, France)*

^c *Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, France.*

^d Máquina fotográfica, Sony Cybershot, DSC- W80, Câmera Digital com 3x Zoom Óptico.

^e Tonopen XL, Mentor Medical Systems.

(paquímetro ultrassônico)^f; ultrassonografia do bulbo ocular em modo-B^g; Fundoscopia indireta e direta; e por último mensuração do diâmetro da fissura palpebral e do diâmetro da córnea^h.

Os testes oftálmicos foram realizados enquanto os coelhos permaneciam mantidos sob contenção manual cuidadosa, com auxílio de toalhas, tomando-se o cuidado para manter o animal confortável. O animal foi posicionado em decúbito esternal, segurando-se o flanco e membros pélvicos. Quando a cabeça do animal era manualmente estabilizada, havia-se um cuidado para não realizar compressão sobre a região do pescoço, na tentativa de prevenir uma mensuração errônea (mais alta) da PIO.

5.4.1.1 Inspeção ocular

Nesta etapa, foram avaliados 344 olhos de 172 coelhos saudáveis (67 machos e 105 fêmeas). As estruturas oculares do segmento anterior foram avaliadas por meio de um transiluminador e biomicroscópio com lâmpada de fenda (Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, France).

5.4.1.2 Teste lacrimal de Schirmer (TLS I)

O teste lacrimal de Schirmer (TLS I) foi realizado em 242 olhos de 121 coelhos. Para realização do teste foram utilizadas tiras de papel estéril de TLS

^f Paquímetro ultrassônico (*Micropach® Sonomed, Model 200P+, Lake Success, NY, USA*).

^g Aparelho *Sonix OP Smart Ultrasound System, Canada*

^h Paquímetro de aço inoxidável (*Neiko Tools, Klamath Falls, Oregon, USA*).

(Teste Lacrimal de Schirmer, Ophthalmos, São Paulo-SP), para mensuração do TLS tipo I (Figura 12 A), o qual mensura a produção basal e parte da produção reflexa da fração aquosa do filme lacrimal.

5.4.1.3 Análise microbiológica

As amostras para análise microbiológicas foram coletadas de 92 olhos de 46 coelhos. Para tanto utilizou-se uma zaragatoa estéril (swab), para cada olho, a qual com movimentos circulatorios tocou suavemente a superfície corneana, conjuntival e porção da conjuntiva da membrana da terceira pálpebra de ambos olhos dos animais (Figura 12 B). Para evitar contaminação secundária tomou-se o devido cuidado para que a zaragatoa não tocasse cílios e pálpebras. O teste foi realizado sem a administração de anestésico tópico, pois a utilização desta droga poderia interferir no crescimento de micro-organismos.

As zaragatoas foram mantidas em meio de transporte, refrigeração e enviados ao laboratório de microbiologia, a fim de identificar a microbiota bacteriana residente. As culturas dos micro-organismos foram realizadas em placas com meio BHI (*brain-heart infusion*) e ágar sangue (sangue de carneiro 5%), as quais permaneceram incubadas a 37°C em ambiente aeróbico durante 24 a 48 horas. As colônias bacterianas obtidas foram identificadas por coloração de *Gram* e procedimentos padrão de avaliação.

5.4.1.4 Estesiometria

Em 224 olhos de 112 animais, a sensibilidade da córnea foi avaliada, utilizando-se o estesiometro de *Cochet-Bonnet* (Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, France) (Figura 12 C) A mensuração foi obtida por meio da observação do estímulo produzido pelo toque do monofilamento de náilon presente no instrumento, na região central da córnea. A mensuração foi repetida por cinco vezes em um mesmo comprimento de fio, sendo o principal reflexo observado no piscar do animal, com discreta retração do bulbo ocular. Caso o animal não apresentasse o estímulo, o valor do comprimento do filamento era reduzido em 5 mm, repetindo-se as mensurações, até que cada coelho viesse a responder com o reflexo do fechamento palpebral.

5.4.1.5 Pressão intra-ocular (PIO)

A PIO foi mensurada em 148 olhos de 74 coelhos, empregando o tonômetro de aplanção (Tonopen XL Mentor, Norwell, MA, USA) (Figura 12 D). Após instilação de colírio anestésico tópico (cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1% solução oftálmica, Laboratório Allergan®, Guarulhos-SP, Brasil) o instrumento foi posicionado perpendicularmente a córnea, tocando-a suavemente, entre três mensurações consecutivas. O resultado final obtido representa uma média, com variação de 5%. Nesta etapa do estudo o avaliador atentou-se por não realizar nenhuma pressão na região cervical do animal, evitando assim possível alteração na mensuração final da PIO.

5.4.1.6 Paquimetria central de córnea

Para medir a espessura central da córnea (ECC), foram mensurados 176 olhos de 88 coelhos, utilizando-se um paquímetro ultrassônico (Micropach® Sonomed, Model 200P+, Lake Success, NY, USA), com a velocidade de som na córnea pré-estabelecida em 1640m/s (Figura 12 E). A espessura central da córnea (ECC) foi estimada após instilação de anestésico tópico estéril (cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1% solução oftálmica, Laboratório Allergan®, Guarulhos-SP, Brasil).

5.4.1.7 Biometria ultrassonográfica em modo-B

No procedimento foram avaliados 116 olhos de 58 coelhos. Para realização do exame ultrassonográfico, foi utilizado o aparelho (*Sonix OP Smart Ultrasound System*, Canadá), com transdutor linear de 14-MHz. Após a instilação de colírio anestésico tópico estéril (cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1% solução oftálmica, Laboratório Allergan®, Guarulhos-SP, Brasil) o transdutor foi posicionado sobre a superfície corneana, perpendicularmente ao centro, utilizando-se um gel acústico de transmissão (*Aquasonic-100, Parker Laboratories Inc., Fairfield, NJ*), tomando o devido cuidado para evitar uma compressão direta e consequentemente o recuo da córnea. As imagens foram obtidas no momento em que a superfície corneana e parede posterior do bulbo ocular puderam ser claramente identificadas na ultrassonografia, de forma que a visualização da imagem das quatro estruturas

de interesse (córnea, face anterior da lente, face posterior da lente e a superfície da retina) fossem simétricas e estivessem centralizadas perpendicularmente ao eixo óptico. Estas imagens foram adquiridas a partir de cortes sagitais e dorsais e então, as mensurações ecobiométricas foram realizadas.

5.4.1.8 Diâmetro da fenda palpebral e diâmetro de córnea

Foram estudados 100 olhos de 50 coelhos para avaliação do diâmetro da fenda palpebral e do diâmetro corneano, para isso foi utilizado um paquímetro de aço inoxidável digital com visor de LCD e precisão de $\pm 0,02$ mm (Neiko Tools, Klamath Falls, Oregon, USA) (Figura 12 F).

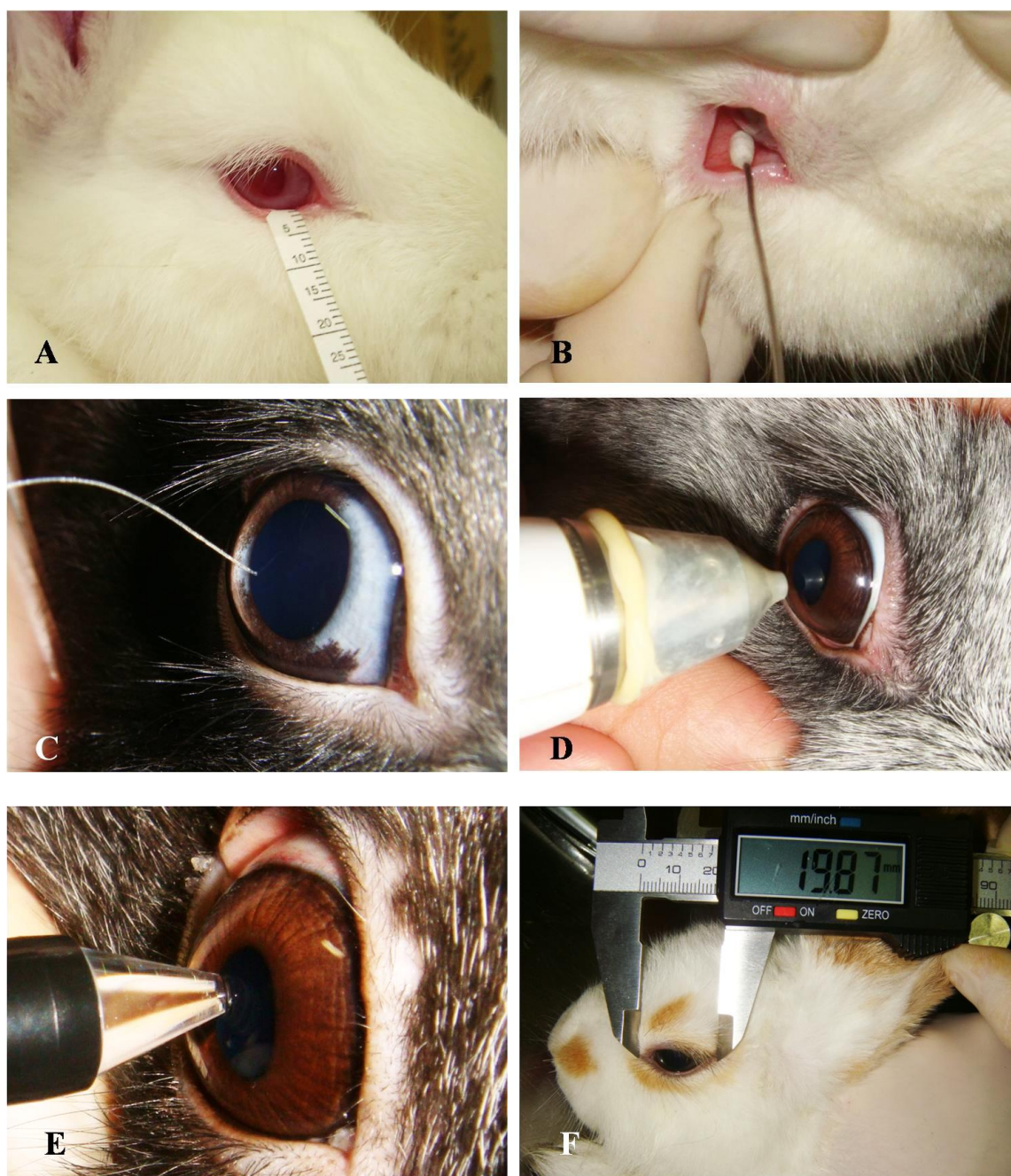


Figura 12-Sequência fotográfica de parte dos testes oculares realizados nos coelhos. A: Teste lacrimal de Schirmer; B: Coleta de amostra de conjuntiva e margem palpebral; C: Análise estesiométrica da córnea central; D: Mensuração da PIO; E: Paquimetria da córnea; F: Mensuração do diâmetro da rima palpebral;

5.4.1.1 Dilatação pupilar

A dilatação foi obtida por meio da utilização de colírios à base de: tropicamida 1%, e fenilefrina 10% (Frumtost, São Paulo, SP, Brasil) com a instilação de uma gota em cada olho, aproximadamente a cada três minutos, durante 10 minutos (ou seja, três aplicações em 10 minutos). Neste procedimento também foi avaliado a dilatação pupilar, em tempo 0, 10, 20, 30 e 40 minutos, sendo assim, comparado a diferença entre as dilatações de coelhos albinos e coelhos com íris mais escuras. Avaliou-se 40 olhos de 20 coelhos.

5.5 Análise estatística

Quando aplicável, foram realizadas análises estatísticas sob os testes, incluindo uma análise de estatística descritiva completa, Teste-*t* (quando houve comparação entre dois grupos de dados), Teste Exato de Fisher (para comparação de proporções, como por exemplo, raças) e teste de correlação de Bartlett (para comparar variáveis contínuas numéricas) utilizando o software JMP, versão 5.0.1 (*SAS Institute Inc., Cary, NC*). Os dados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão e foram considerados significativos quando o valor de $P < 0,05$.

5.6 RESULTADOS

Todos os dados contínuos numéricos obtidos para todos os testes oftálmicos utilizados na população desta pesquisa apresentaram uma distribuição normal de acordo com teste de Kolmogorov-Smirnov Goodness-of-Fit. A Tabela 4 contém os resultados das análises estatísticas descritivas dos testes oftálmicos de coelhos e os resultados comparativos entre raças com as médias encontradas no Teste lacrimal de *Schirmer*, na Pressão intra-ocular e na estésimetria oftálmicos que apresentaram significância ($P < 0,05$) (Tabela 5 e Tabela 6).

Tabela 4-Resultados obtidos para os testes de diagnóstico oftalmológicos e achados ecobiométricos o olho de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

| Exames | No coelhos | No de olhos | Média | Mediana | DesvPad* | CV** |
|--|------------|-------------|-------|---------|----------|------|
| Teste lacrimal de <i>Schirmer</i> (mm/min) | 121 | 241 | 6,31 | 6,00 | 3,20 | 0,51 |
| Pressão intra-ocular (mmHg) | 84 | 168 | 17,39 | 18,00 | 3,21 | 0,19 |
| Estesimetria (cm) | 112 | 224 | 1,52 | 1,50 | 0,72 | 0,47 |
| Diâmetro da fenda palpebral (mm) | 50 | 100 | 19,34 | 19,22 | 2,12 | 0,11 |
| Diâmetro da córnea (mm) | 50 | 100 | 11,95 | 12,10 | 1,38 | 0,12 |
| Espessura da córnea central (mm) | 88 | 176 | 0,38 | 0,38 | 0,04 | 0,11 |
| Comprimento axial do bulbo ocular (cm) | 58 | 116 | 1,50 | 1,51 | 0,08 | 0,05 |
| Profundidade da câmara anterior (cm) | 58 | 116 | 0,25 | 0,25 | 0,03 | 0,11 |
| Diâmetro da lente (cm) | 58 | 116 | 0,62 | 0,62 | 0,06 | 0,10 |
| Profundidade da câmara vítrea (cm) | 58 | 116 | 0,64 | 0,64 | 0,05 | 0,08 |

DesvPad* = desvio padrão

CV** = coeficiente de variação

Tabela 6-Resultados estatísticos (média e desvio padrão) da raça Rex Borboleta e Lion comparativamente a diferentes raças avaliadas, que apresentaram significância para o TLS, pressão intra-ocular e estésimetria pelo teste T de Student ($P<0,05$).

| Exames | Rex/Borboleta | | | | | | Lion | |
|--------------|---------------|---------------|------------|---------------|----------------|----------------|-----------|----------------|
| | Lion | Rex/Borboleta | Rex Preto | Nova Zelândia | Gigante Branco | Gigante Alemão | Rex | Gigante Alemão |
| TLS | 4,25±1,5 | 5,06±2,84 | 8,21±5,82* | 6,31±2,77* | 8,5±3,39* | 9,5±0,70* | 8±0,0* | 9,5±0,70* |
| PIO | . | 17,91±2,84 | 16,16±2,69 | 17,5±3,56 | 17,00±2,96 | . | . | . |
| Estésimetria | 1,00±0,57 | 1,3±0,53 | 1,57±0,38 | 1,63±0,78* | 1,16±0,40 | 0,75±0,35 | 0,75±0,35 | 0,75±0,35 |

Tabela 5-Resultados estatísticos (média e desvio padrão) da raça Rex Amarelo comparativamente a diferentes raças estudadas nesta pesquisa, que apresentaram significância para o TLS, pressão intra-ocular e estésimetria pelo teste T de Student ($P<0,05$).

| Exames | Rex Amarelo | | | | | | Lion | |
|--------------|-------------|------------|---------------|----------------|-------------|-------------|----------------|------------|
| | Rex Amarelo | Rex | Rex/Borboleta | Gigante Branco | Rex Preto | Chinchilla | Gigante Alemão | Lion |
| TLS | 5,95±2,56 | 8±0,0 | 5,06±2,84 | 8,5±3,39 | 8,21±5,82 | 6,52±3,51 | 9,5±0,70 | 4,25±1,5 |
| PIO | 18,62±28 | . | 17,91±2,84 | 17,00±2,96 | 16,16±2,69* | 16,29±3,32* | . | . |
| Estésimetria | 1,82±0,71 | 0,75±0,35* | 1,3±0,53* | 1,16±0,40* | 1,57±0,38 | 1,54±0,70 | 0,75±0,35* | 1,00±0,57* |

5.6.1 Anatomia da órbita

A órbita óssea dos coelhos é constituída por uma série de ossos cujas articulações entre si podem não ser muito evidentes, pois se apresentam, em grande parte, fusionadas no animal adulto. Em certas articulações, como nas articulações mais caudais do osso maxilar, a fusão pode já estar presente até mesmo em animais com idade entre um e dois meses de vida ¹⁰. Diesem (1964), ainda relata que esqueletos da cabeça de coelhos com trinta dias de idade não demonstram evidências do ponto de articulação entre o processo zigomático do maxilar e o osso zigomático. Assim, o referido autor postula que o osso zigomático é tão perfeitamente contínuo com o osso maxilar que não é possível determinar na extremidade rostral do arco zigomático qual parte é formada pelo osso maxilar e qual parte é formada pelo osso zigomático.

Apesar da visível irregularidade da margem supraorbital, formada pelo osso frontal, o contorno geral da órbita no aspecto lateral (Figura 13 B) é aproximadamente circular, mas tende a elipsoide com a presença de uma angulação aguda rostroventralmente, no limite entre as margens supra e infraorbitais, entre o processo lacrimal e o processo zigomático do maxilar (Figura 13 D). O processo zigomático do frontal (Figura 13 A, B, C e D) constitui um amplo segmento da margem supraorbital. Destaca-se dorsalmente da face orbital do osso, estendendo-se nas direções rostral e caudal, de modo a constituir grande parte da parede dorsal da cavidade orbital. Uma extensa incisura supraorbital caudal (Figura 13 A) separa o segmento caudal do processo do restante do osso frontal, enquanto que o segmento rostral se destaca por uma incisura supraorbital rostral (Figura 13 A). Pode-se considerar

a órbita dos coelhos como aberta, assim como a dos carnívoros, visto que o processo zigomático do frontal não se articula diretamente com o arco zigomático, constituído pelo processo zigomático do temporal, osso zigomático e processo zigomático do maxilar (Figura 13 B, C e D). Um forte ligamento fibroso (ligamento orbital) se estende do processo zigomático do frontal ao arco zigomático ¹¹, terminando por completar a órbita de forma similar como ocorre nos carnívoros. A margem dorsal do arco zigomático, por sua vez, constitui praticamente a totalidade da margem infraorbital, provida de sutis irregularidades e consideravelmente menos côncava que a margem supraorbital. O túber facial é uma evidente projeção localizada na extremidade rostral do arco zigomático, a qual fornece superfície para fixação do músculo masseter ¹².

A parede medial da órbita é côncava e constituída essencialmente pela face orbital do frontal, asa do pré-esfenoide e lâmina perpendicular do palatino ¹². O osso frontal apresenta um único forame, o forame etmoidal, muito diminuto e localizado no limite com a asa do pré-esfenoide; está localizado dorsorostralmente ao canal óptico ^{10; 12} e permite a passagem dos vasos e do nervo etmoidais ^{13, 14}.

O canal óptico está localizado na asa do osso pré-esfenoide e fornece passagem ao nervo óptico e à artéria etmoidal interna ¹²; a área ao seu redor fornece fixação aos músculos extraoculares, exceto ao músculo oblíquo ventral, que se origina rostralmente na órbita, caudalmente ao forame esfenopalatino a parte mais elevada do tubérculo alveolar do maxilar (Figura 13 B, C e D) ^{15; 11}. Segundo Diesem (1964), o canal óptico de coelhos se diferencia

do canal óptico da maioria das demais espécies de mamíferos, pois a cada lado se comunica com a cavidade craniana e, conseqüentemente, com o seu par contralateral no plano mediano. O referido autor relata que o esqueleto macerado da cabeça de animais adultos revela que a comunicação que existe entre as órbitas direita e esquerda é de aproximadamente 5 mm de diâmetro e, ainda, sugere que tal acesso direto entre as órbitas permite que doenças instaladas em um olho ou órbita possam facilmente ser transmitidas ao olho ou órbita contralateral.

A fissura orbital (Figura 13 B e D) está localizada ventralmente ao canal óptico e compreende um grande espaço entre a lâmina perpendicular do palatino, asa do pré-esfenoide e osso basisfenoide. Em esqueletos macerados da cabeça é observado, através da fissura orbital, o corpo do osso pré-esfenoide (Figura 13 D). Seu diâmetro dorsoventral é de aproximadamente 7 mm em um animal adulto e 5 mm em um animal de três meses de idade, enquanto que as suas dimensões horizontais são sempre menores do que tais medidas; dorsalmente 4 mm e ventralmente de 2 a 3 mm entre suas margens rostral e caudal, em adultos ¹⁰. Além de alguns elementos vasculares, a fissura orbital fornece passagem para os nervos oculomotor, troclear, abducente e oftálmico, que suprem anexos oculares ^{12; 10; 14}.

Um par de forames alares e um forame espinhoso (Figura 13 D) estão localizados caudoventralmente, próximos ao assoalho ósseo da órbita, no osso basisfenoide ¹². Tais forames fornecem passagem ao ramo mandibular do nervo trigêmeo e a ramos da artéria maxilar à medida que estes adentram a órbita ¹⁰.

O osso maxilar contribui para a formação de grande parte da parede rostral da órbita. Uma grande projeção, o tubérculo alveolar do maxilar, se destaca no aspecto rostroventral da cavidade orbital (Figura 13 B, C e D). Lagomorfos apresentam uma fórmula dentária que consta de três dentes pré-molares e três dentes molares superiores ¹⁶. O tubérculo alveolar do maxilar contém os alvéolos do 3º dente pré-molar e dos três dentes molares superiores. Geralmente três áreas elevadas e separadas por sulcos se destacam da superfície dorsal do tubérculo denunciando os alvéolos do 3º pré-molar e do 1º e 2º molares (Figura 13 B, C e D), enquanto que o assoalho do alvéolo do 3º dente molar superior pouco se destaca, pois este dente é muito menor, mais delgado e mais curto que os demais molares e pré-molares. Medialmente ao tubérculo alveolar do maxilar existem ao menos três forames que fornecem passagem a estruturas que deixam a órbita ¹⁰. O mais ventral deles é o forame palatino, através do qual passa a artéria palatina em direção ao palato duro. Dorsalmente a este se encontra o forame esfenopalatino, através do qual passam elementos vasculares e nervosos que seguem para a cavidade nasal. Por fim, o mais dorsal dos forames, o forame maxilar, permite a passagem para a artéria e o nervo infraorbitais para dentro do canal infraorbital ¹⁰. O canal infraorbital se abre através do forame infraorbital na superfície lateral trabeculada do osso maxilar, rostral e dorsalmente ao arco zigomático (Figura 13 B). Diesem (1964) relata que o forame infraorbital se localiza a cerca de 5 mm dorsalmente à margem alveolar do primeiro dente molar superior. A parede rostral da órbita ainda conta com uma grande contribuição do osso lacrimal, articulado com o osso frontal dorsalmente e com o maxilar ventral e medialmente. No entanto a contribuição do osso lacrimal para a margem orbital

é pequena, mas relevante devido ao proeminente processo lacrimal (Figura 13 B, C e D). Tal processo pode ser palpado no animal vivo, pois é recoberto apenas por pele e tela subcutânea¹⁰. O osso não apresenta articulações firmes e pode ser facilmente removido do esqueleto macerado da cabeça. O forame lacrimal (Figura 13 C) se localiza medialmente e logo ventralmente ao processo lacrimal e conduz o ducto nasolacrimal à cavidade nasal.

5.6.2 Observações gerais nos animais vivos

Foram avaliados 172 animais, livres de doenças sistêmicas, conforme determinado pelo exame físico e avaliação hematológica e bioquímica¹⁷ e pelo exame físico geral. Destes animais, a proporção entre machos e fêmeas na população estudada foi de 38,95% machos para 61,04% fêmeas (67 coelhos machos, 105 coelhos fêmeas). A idade média foi de $4,47 \pm 0,72$ meses e o peso médio foi de $2,06 \pm 0,81$ g. Com relação às raças estudadas as porcentagens encontradas estão referenciadas na (Tabela 3), e as cores dos animais variaram entre preto, branco, marrom, amarelo e cores mistas entre essas tonalidades.

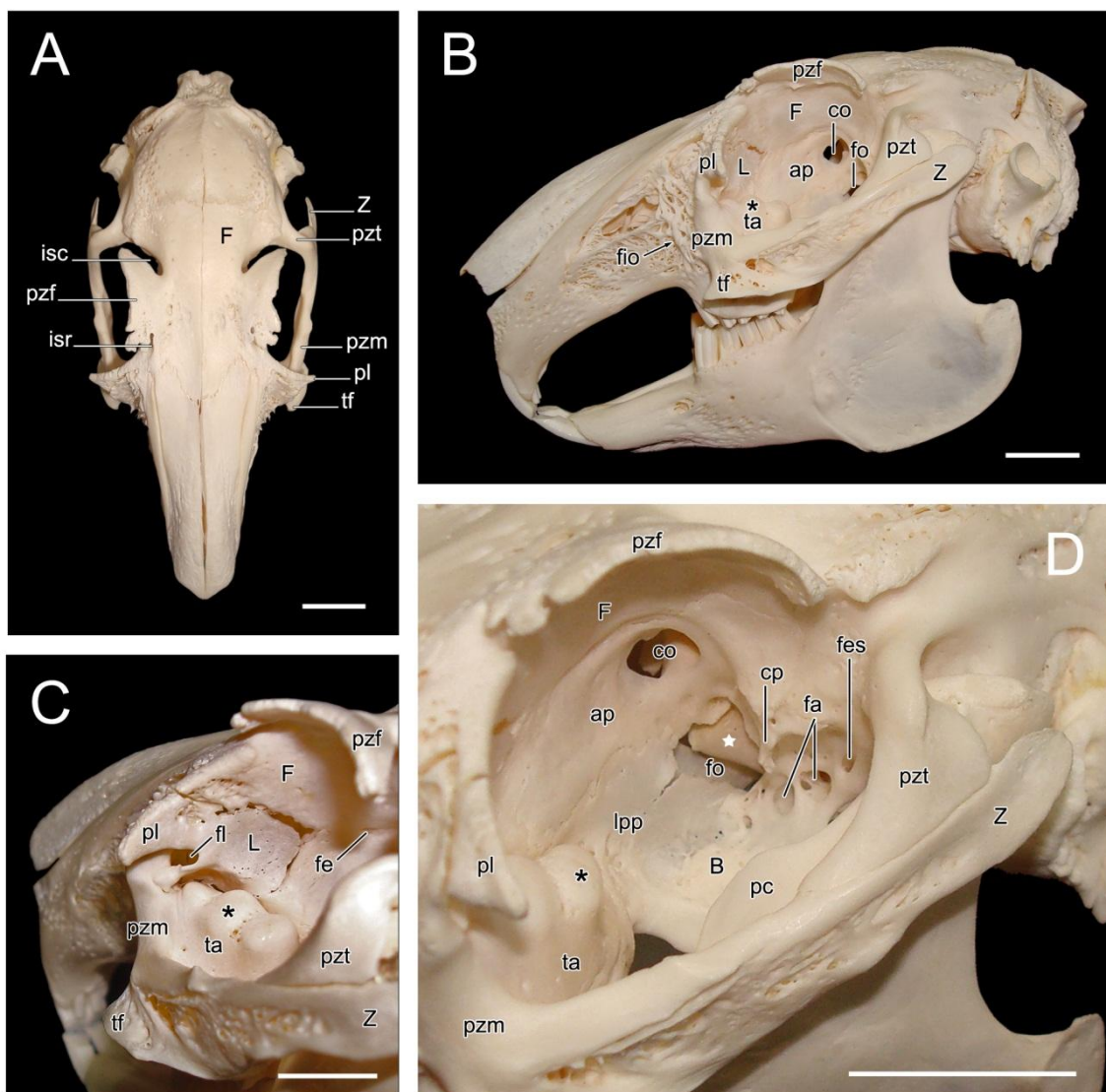


Figura 13-Elementos ósseos da órbita de coelho doméstico adulto e macho. A) Aspecto dorsal do esqueleto da cabeça, sem mandíbula; B) Aspecto lateral do esqueleto da cabeça, com mandíbula; C) Aspecto caudolateral da parede rostral da órbita; D) Aspecto rostrodorso da órbita óssea, evidenciando as paredes medial e ventral. Legenda: **ap**, asa do osso pré-esfenoide; **B**, osso basisfenoide; **co**, canal óptico; **cp**, crista pterigoidea; **F**, osso frontal; **fa**, forames alares; **fe**, forame etmoidal; **fes**, forame espinhoso; **fl**, forame lacrimal; **fo**, fissura orbital (★ indica o corpo do osso esfenoide); **isc**, incisura supraorbital caudal; **isr**, incisura supraorbital rostral; **L**, osso lacrimal; **lpp**, lâmina perpendicular do palatino; **pc**, processo coronoide da mandíbula; **pl**, processo lacrimal; **pzm**, processo zigomático do maxilar; **pzt**, processo zigomático do temporal; **ta**, tubérculo alveolar do maxilar (★ indica o alvéolo do 1º dente molar superior); **tf**, túber facial; **Z**, osso zigomático. Barras: 1cm.

5.6.3 Observações da morfologia ocular externa em animais vivos

Foi observado que os olhos dos coelhos apresentavam-se em um eixo visual divergente, assim o campo visual total eram de aproximadamente de 360°, sendo o campo visual unioocular de 80°.

Externamente os olhos destes animais apresentam finos cílios em ambas as pálpebras, superior e inferior e glândulas tarsais que desembocam nas margens palpebrais. As pálpebras superiores apresentam-se mais curta e espessa que as pálpebras inferiores, e foi observada leve rotação da margem palpebral superior em direção a superfície ocular, entretanto não chegando a ser um entrópio palpebral. Os coelhos estudados, de modo geral apresentaram despigmentação tarsal, contudo, nos coelhos da raça Chinchila foram observados áreas de pigmentação palpebral (Figura 14 A).

Segurando-se delicadamente ambas as pálpebras abertas, com pressão digital simultânea foi possível observar uma discreta exoftalmia reversível após a compressão. A carúncula lacrimal e a prega semilunar da conjuntiva (terceira pálpebra) são bem desenvolvidas e móveis e estão presentes no canto medial do olho. Em sua margem foi observada uma leve pigmentação, com presença de pontos circulares elevados no epitélio da conjuntiva em sua face palpebral (Figura 14 A e B), com exceção dos coelhos albinos, que apesar de não apresentarem pigmento apresenta os mesmos pontos circulares (Figura 14 C e D). A movimentação da terceira pálpebra é sobre a superfície ocular, não chegando a ultrapassar a metade da córnea, sendo esta em direção diagonal superior, horizontalmente e paralelamente ao fórnice palpebral.

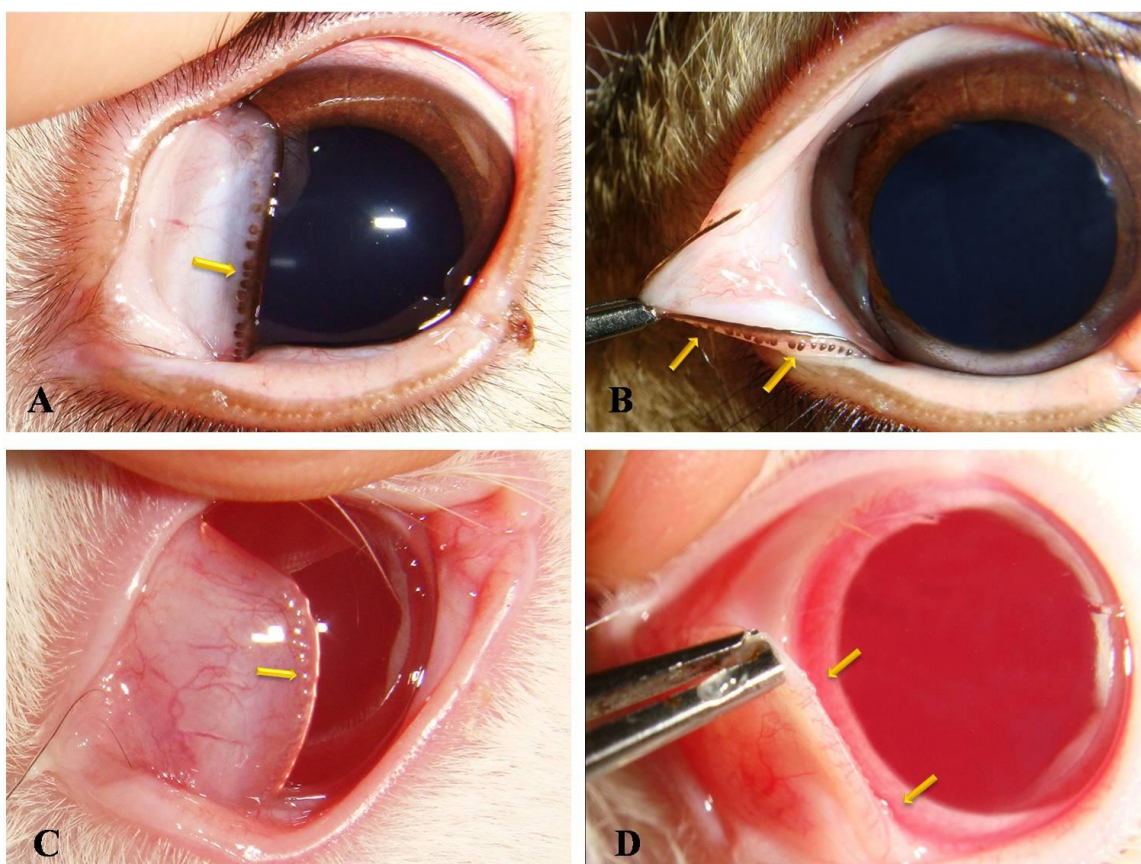


Figura 14 - Imagem da terceira pálpebra do olho esquerdo de diferentes coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). A e B: Presença de pigmentação na borda da terceira pálpebra, com pontos circulares elevados no epitélio da conjuntiva na face palpebral. C e D: Presença da mesma estrutura, porém sem a presença de pigmentação, por se tratar de um coelho albino.

Nos coelhos é possível observar o seio venoso envolvendo os músculos extraoculares, com exceção, do músculo oblíquo superior, que pode estar intimamente próximo a cápsula de Tenon, por sua vez o músculo reto superior, é facilmente visualizado, é delgado, com coloração rósea e sua inserção é na esclera, a 1mm próximo ao limbo superior (Figura 15 A e B).

Estes animais possuem ainda, apenas um ponto lacrimal, situada na extremidade distal da pálpebra inferior. A córnea é relativamente ampla em

relação à fissura palpebral e o restante do bulbo ocular e a câmara anterior observada lateralmente é profunda.

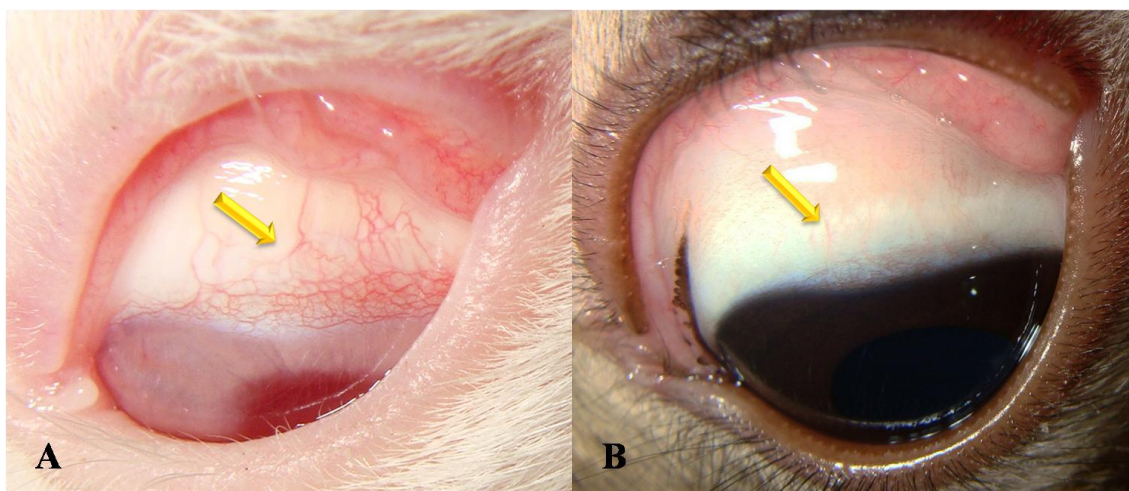


Figura 15 - Imagem de olhos de coelhos. A e B: Observe o seio venoso próximo aos músculos extraocular, reto dorsal, e da região do limbo.

A íris pode apresentar diferentes graus de pigmentação, que pode variar de tonalidade de acordo com a pelagem do animal. Varia dos tons castanhos nas pelagens pretas, mesclados e amarelos; os tons de ferrugem (cinza com marrom) (Figura 16 A) e as heterocromias (azul e marrom) (Figura 16 B, C e D) foram observados nos animais da raça Chinchila que apresentaram pêlo cinza; e geralmente os coelhos albinos apresentaram em sua maioria uma íris pobremente pigmentada de coloração vermelha (Figura 16 B) e em alguns casos altamente pigmentados com tons de azul e marrom (Figura 16 A e D). Não foi observado o círculo arterial maior nestes animais, entretanto a morfologia da íris é levemente abaulada em sua margem pupilar voltada para a câmara anterior, não sendo visualizado o epitélio pigmentar da íris, lembrando um entrópio uveal (Figura 17 A e B).

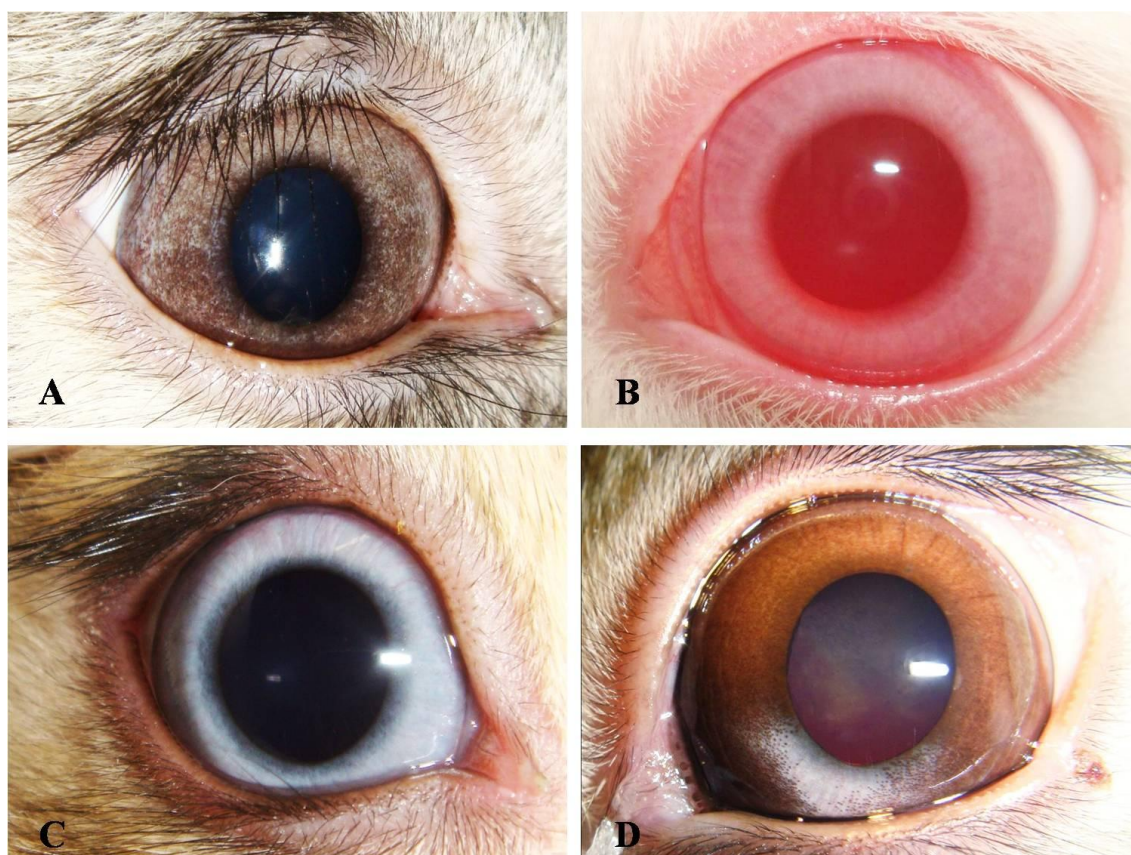


Figura 16 - Imagem de olhos de coelhos com diferentes cores de Iris e presença de finos cílios em pálpebra superior e inferior. Observe, também uma leve rotação da margem palpebral superior em direção a superfície ocular, entretanto não chegando a ser um entrópio palpebral e a presença de uma leve pigmentação na margem palpebral de coelhos da raça chinchila (Figura A,C e D).

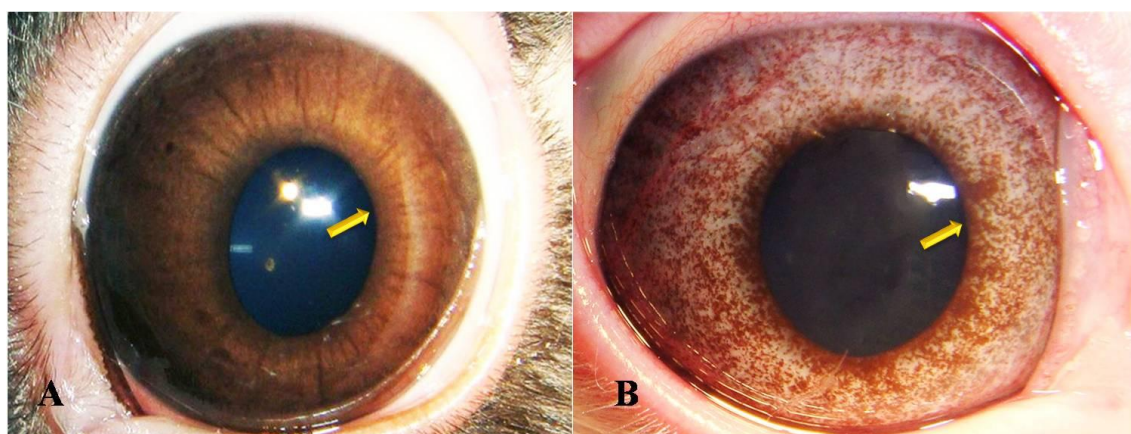


Figura 17 - Imagem da íris, observe que ela é levemente abaulada em sua margem pupilar, voltada para câmara posterior, não sendo possível visualizar o epitélio pigmentar da íris, lembrando um entrópio uveal.

A forma da pupila nos coelhos é circular, normalmente permanecem em estado de midríase na presença de ambiente de pouca luz, no entanto, realizam semi-constricção, mantendo a sua forma oval em ambientes claros. As pupilas dos animais de coloração mais escura, ao serem iluminadas por um transiluminador *de Finoff*, tendeu a formar miose parcial e mais lenta (**Figura 18 A e B**) comparativamente aos animais albinos, com íris mais clara ou pobremente pigmentada, onde a forma da pupila permaneceu mais circular e mais miótica (Figura 18 C e D).

As pupilas dos coelhos em geral responderam lentamente a total dilatação farmacológica. Após uma hora de tratamento instilando-se uma gota de tropicamida 1%, e uma gota de fenilefrina 10% (intervalo 3 minutos entre cada uma), realizadas a cada 10 minutos, durante seis vezes, observou-se que com 10 minutos ambos os animais (pupilas claras e escuras) iniciaram a dilatação pupilar. Os coelhos com íris mais claras responderam com uma dilatação total maior e mais rápida, em aproximadamente 20 minutos (Figura 18 C e D), comparativamente aos coelhos com íris de escura, e os que apresentaram heterocromia de íris, onde a dilatação total foi mais lenta e menor em aproximadamente 40 minutos. Contudo, não se observou uma dilatação completa, principalmente nas íris pigmentadas, quando comparada a dilatação observada em cães e gatos (mantendo a pupila em sua forma ampla e oval) (Figura 18 A e B).

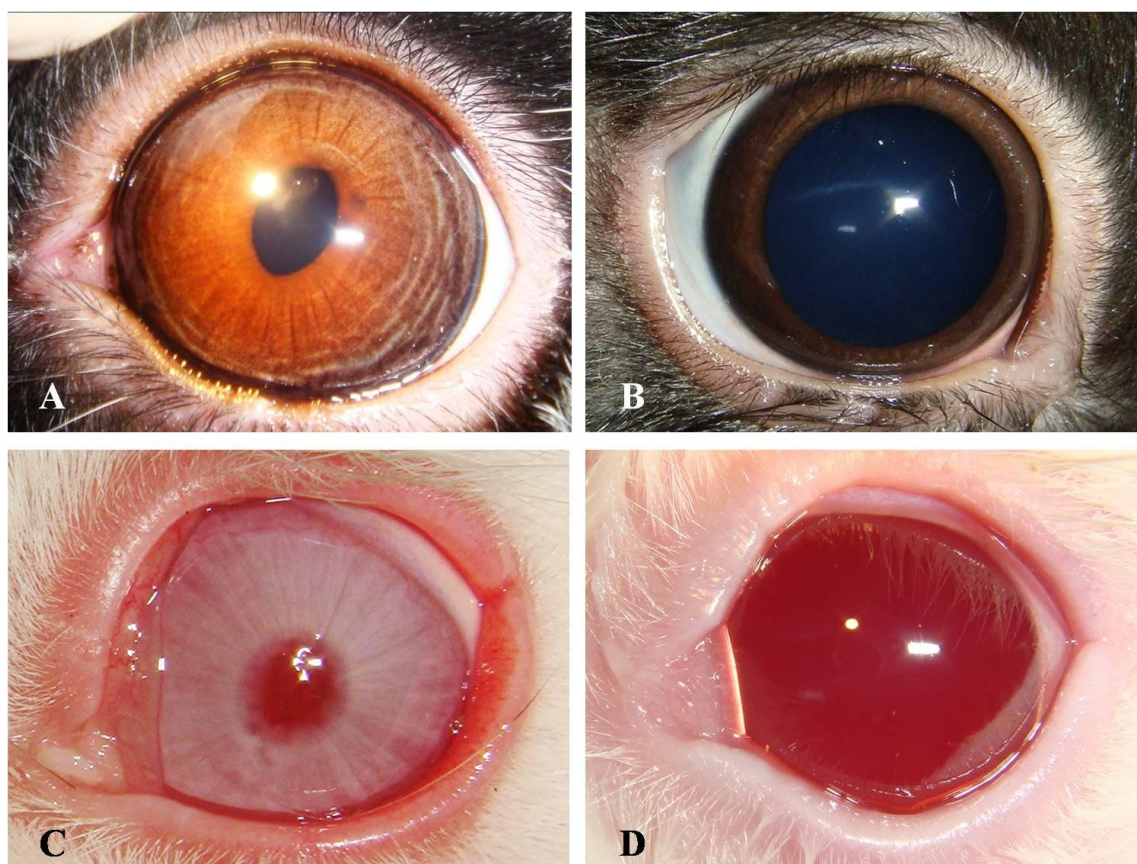


Figura 18 - Comparação entre pupilas de cor marrom e pupilas pouco pigmentadas tanto em miose quanto em midríase farmacológica. A: Coelho representante de íris marrom escura. Observe que este formato da pupila tende a ser mais oval durante a miose. B: Coelho com íris marrom escura responderam pobremente e mais lentamente à dilatação farmacológica do que às com íris de coloração clara. C: Neste coelho com íris de coloração clara, observou uma miose maior quando comparada ao coelho de íris castanho- escura. D: Coelhos com a íris pouco pigmentada responderam melhor à dilatação farmacológica. Observe que a pupila sob midríase em animais com íris pouco pigmentadas apresentaram dilatação completa quando comparada aos coelhos de íris escura.

5.6.4 Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)

Os resultados médios encontrados do teste Lacrimal de Schirmer, de 242 olhos de 121 animais foram $6,31 \pm 3,19$ mm/min. De acordo com o sexo e olho dos animais, as fêmeas apresentaram a média de $6,08 \pm 3,36$ mm/min nas

fêmeas, já nos machos a média foi de $6,69 \pm 2,87$ mm/min e $6,46 \pm 3,24$ mm/min para o olho direito e $6,16 \pm 3,15$ mm/min para o olho esquerdo. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas com relação aos valores médios do TLS ($P = 0,166$) ou olho direito e esquerdo ($P = 0,47$). Com relação às raças houve diferença significativa nos valores de P entre as raças Rex Preto, Rex/borboleta ($P = 0,019$), Lion e Gigante Alemão ($P = 0,010$), Gigante Alemão, Rex/borboleta ($P = 0,037$), Lion, Rex ($P = 0,02$), Nova Zelândia, Rex/borboleta ($P = 0,035$), Rex/borboleta, Gigante Branco ($P = 0,01$).

5.6.5 Análise microbiológica

Foram identificados organismos bacterianos, em 56 das 92 amostras microbiológicas coletadas (60,86%). Um total de 75 cepas bacterianas foram identificadas das amostras adquiridas da superfície ocular. Os resultados da cultura demonstraram que houve predominância de bactérias Gram-positivas em (85,3%). O gênero mais prevalente foi a *Staphylococcus coagulase* negativo (SCN) (38,7%), seguidos de *Micrococcus* sp. (12%) e *Difteroides aeróbicos* (12%). Neste estudo apenas 11 cepas Gram-negativas foram isoladas, sendo elas: *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp. *Pasteurella multocida*, *Alcaligenes* sp. e *Neisseria* sp.

Do total de 92 olhos analisados, 40 (43,47%) olhos apresentaram apenas uma espécie de bactéria isolada, 13 (14,13%) bulbos oculares tiveram duas espécies isoladas, e em apenas três (3,26%) olhos foi encontrado três

tipos de espécies bacterianas. A Tabela 7 contém os resultados condensados das análises microbiológicas.

Tabela 7 - Frequência de bactérias aeróbias isoladas de superfície ocular de 92 olhos de coelhos, aparentemente saudáveis.

| Tipos de bactérias | <i>n</i> | (%) |
|--|-----------------|-------------|
| Gram-positiva | 64 | 85,3 |
| Staphylococcus sp. | 34 | 45,3 |
| SCN | 29 | 38,7 |
| SCP | 5 | 6,7 |
| Micrococcus sp. | 9 | 12,0 |
| Streptococcus sp. | 6 | 8,0 |
| Bacillus sp. | 6 | 8,0 |
| Difteróides aeróbicos | 9 | 12,0 |
| Gram-negativa | 11 | 14,7 |
| <i>Escherichia coli</i> | 2 | 2,7 |
| Enterobacter sp. | 1 | 1,3 |
| Serratia sp. | 1 | 1,3 |
| Pseudomonas sp. | 2 | 2,7 |
| <i>Pasteurella multocida</i> | 1 | 1,3 |
| Alcaligenes sp. | 2 | 2,7 |
| Neisseria sp. | 2 | 2,7 |
| Total de bactérias isoladas | 75 | 100% |
| Numero de amostras | 92 | 100% |
| Amostras sem crescimento bacteriano | 36 | 39.1% |
| Total de amostras com crescimento bact | 56 | 60.9% |

5.6.6 Estesiometria da córnea

Foram avaliados 224 olhos de 112 animais, a média encontrada foi de $1,52 \pm 0,71$ cm. De acordo com o gênero o valor médio encontrado para fêmeas foram $1,48 \pm 0,69$ cm, e para machos foram de $1,62 \pm 0,75$ cm. Com relação aos olhos dos animais, o olho direito apresentou uma média de 1,49

$\pm 0,74$ cm, já o olho esquerdo foi de $1,55 \pm 0,68$ cm. Não houve diferença significativa para estesiometria entre fêmeas e machos ($P = 0,160$), nem entre os olhos direito e esquerdo ($P = 0,574$). Com relação às raças, houve diferença significativa entre as raças ($P = 0,046$). As raças que apresentaram diferença nesta avaliação foram Rex Preto ($P = 0,042$) Rex/Amarelo ($P = 0,044$).

5.6.7 Pressão intra-ocular (PIO)

A média da PIO encontrada em 168 olhos de 84 animais neste trabalho foi $17,39 \pm 3,20$ mmHg. A PIO mensurada foi de $17,34 \pm 3,31$ mmHg para as fêmeas e $17,58 \pm 3,00$ mmHg para os machos. No olho direito, a média da PIO observada foi de $17,30 \pm 3,40$ mmHg, já a média do olho esquerdo foi de $17,47 \pm 3,02$ mmHg. Não houve diferença significativa entre a pressão intraocular para machos e fêmeas ($P = 0,651$), ou entre olhos esquerdo e direito ($P = 0,734$).

5.6.8 Espessura corneana central

O valor médio encontrado, em 176 olhos de 88 animais, da espessura corneana central foi de $0,38 \pm 0,04$ mm. Avaliando o sexo de cada animal, os valores médios encontrados foram $0,37 \pm 0,03$ mm para coelhos fêmeas e $0,386 \pm 0,046$ mm para coelhos machos. De acordo com os olhos, o valor médio do olho direito foi de $0,38 \pm 0,04$ mm e $0,38 \pm 0,03$ mm para o olho esquerdo. A espessura corneana central é significativamente maior em machos

($P= 0,028$). Contudo, não houve diferença significativa na paquimetria corneana entre os olhos direito e esquerdo ($P=0,705$).

5.6.9 Biometria ultrassonográfica de modo –B

Em 116 olhos de 58 coelhos avaliados, o comprimento axial médio do bulbo ocular foi de $1,50 \pm 0,08$ cm para fêmeas e $1,49 \pm 0,05$ cm para os machos, $1,5 \pm 0,08$ mm de média para o olho direito e $1,50 \pm 0,07$ cm para o olho esquerdo. O valor médio da profundidade da câmara anterior (comprimento axial da câmara anterior) foi de $0,25 \pm 0,02$ cm para coelhos fêmeas e de $0,24 \pm 0,02$ cm para coelhos machos. Avaliando o valor médio do comprimento axial da câmara anterior de ambos os olhos, o olho direito apresentou $0,25 \pm 0,027$ cm e o olho esquerdo $0,25 \pm 0,02$ cm. A espessura média da lente (comprimento axial da lente) foi de $0,61 \pm 0,06$ cm para fêmeas e de $0,61 \pm 0,04$ cm para machos e $0,61 \pm 0,05$ cm para o olho direito e $0,61 \pm 0,06$ cm para o olho esquerdo. A câmara vítrea apresentou profundidade (comprimento axial da câmara posterior) de $0,63 \pm 0,04$ cm para fêmeas e de $0,64 \pm 0,05$ cm para machos e $0,64 \pm 0,03$ cm para o olho direito e $0,63 \pm 0,05$ cm para o olho esquerdo (**Figura 19**). Não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados ecobiometricamente entre machos e fêmeas ou entre olhos direito e esquerdo ($P> 0,05$).

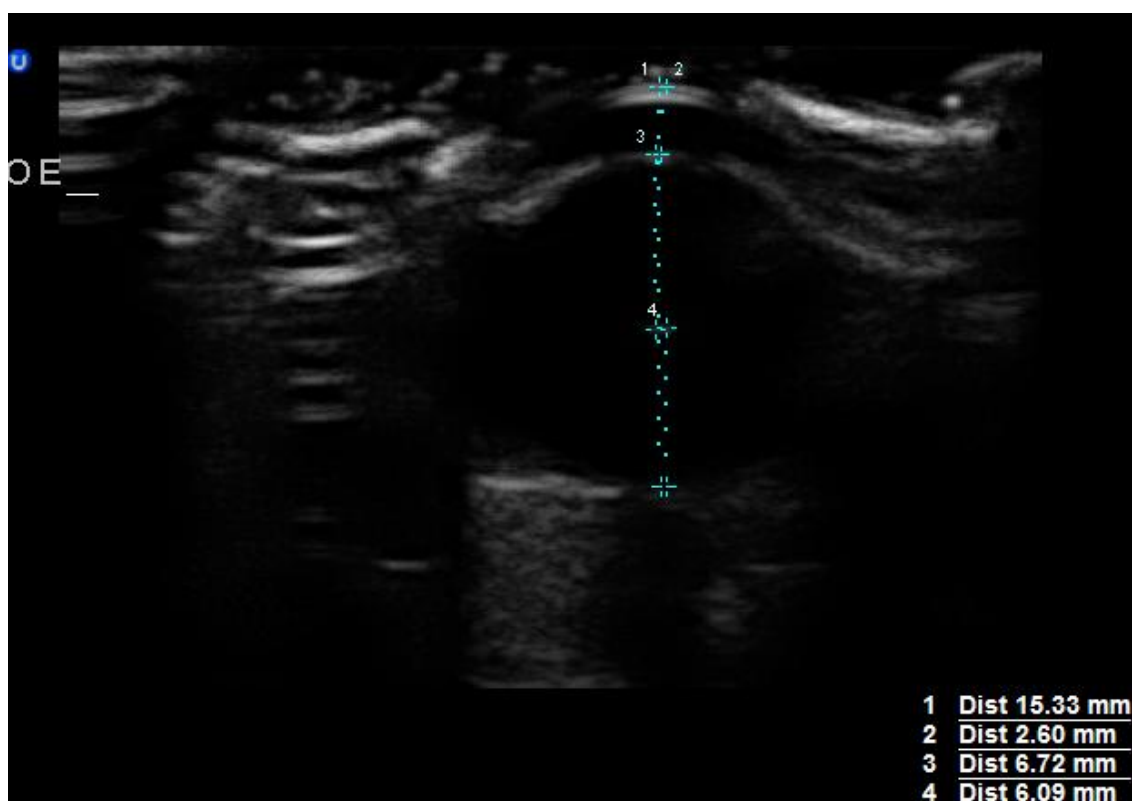


Figura 19 - Ultrassonografia ocular em modo-B após posicionamento ideal. Os quatro principais pontos de referência (córnea, face anterior da lente, face posterior da lente, superfície da retina) ao longo do eixo axial do bulbo ocular são todos perpendiculares. Nesta imagem representativa, observam-se quatro linhas tracejadas que foram colocadas sobre a imagem capturada pelo sistema ultrassônico: 1) comprimento axial do bulbo ocular; 2) profundidade da câmara anterior; 3) comprimento da lente; 4) profundidade da câmara vítrea.

5.6.10 Diâmetro de Fenda Palpebral e Diâmetro de Córnea

Foram avaliados o diâmetro de fenda palpebral em 100 olhos de 50 coelhos, os quais apresentaram a média de $19,30 \pm 2,02$ mm para fêmeas e de $19,37 \pm 2,22$ mm para machos. Em relação aos olhos, a média encontrada foi de $19,62 \pm 2,03$ mm para olho direito e $19,05 \pm 2,17$ mm para olho esquerdo. Avaliando este parâmetro quanto ao gênero e olhos dos coelhos não houve diferença significativa entre machos e fêmeas ($P = 0,882$) ou entre olhos direito

e esquerdo ($P = 0,185$). Nestes mesmos animais foram mensurados o diâmetro corneano, onde o valor médio encontrado foi de $11,91 \pm 1,33$ mm em coelhos fêmeas e de $12,00 \pm 1,43$ mm em coelhos machos, e $12,09 \pm 1,32$ mm para olho direito e $11,81 \pm 1,43$ mm para olho esquerdo. Não houve diferença significativa entre sexo (machos e fêmeas) ($P = 0,738$) ou entre olhos direito e esquerdo ($P = 0,318$).

5.7 DISCUSSÃO

O osso zigomático em coelhos é contínuo com o osso maxilar, de tal forma que não é possível determinar com exatidão os limites da articulação entre estes dois ossos na extremidade rostral do arco zigomático, portanto não é evidente, mesmo em animais muito jovens, qual parte do arco zigomático é formada pelo osso maxilar e qual parte é formada pelo osso zigomático. Já em chinchilas a articulação do osso zigomático com o processo zigomático do osso maxilar é facilmente reconhecida, pois geralmente não se encontra fusionada, mesmo em animais adultos. Ainda, em coelhos, da mesma forma como em chinchilas, o osso zigomático se articula caudalmente com o processo zigomático do osso temporal, no entanto se prolonga mais caudalmente, ventralmente ao referido processo, de modo a se projetar sobre o processo condilar da mandíbula. Este padrão, portanto, difere da posição do osso zigomático de chinchilas, o qual é exatamente entre esses os processos zigomáticos do maxilar e do temporal ¹⁸. Adicionalmente, a posição do arco zigomático de coelhos em relação ao eixo longo da cabeça (incisivo-occipital) é

oblíqua, no sentido dorsocaudal e de modo que a extremidade rostral é direcionada ventralmente, o que contrasta com a posição praticamente paralela do arco zigomático de chinchilas, em relação ao referido eixo ¹⁸.

A margem dorsal do arco zigomático de coelhos, por sua vez, constitui praticamente a totalidade da margem infraorbital, provida de sutis irregularidades e consideravelmente menos côncava que a margem supraorbital. Semelhante ao formato côncavo observado no arco zigomático de gerbilos e hamsters. Tal forma é diferente ao arco zigomático da chinchila que se apresenta liso, convexo e mais largo rostralmente. ^{18, 19}

O contorno geral da órbita no aspecto lateral é aproximadamente circular, mas tende a elipsóide com a presença de uma angulação aguda rostroventralmente, no limite entre as margens supra e infraorbitais, entre o processo lacrimal e o processo zigomático do maxilar. Portanto a forma da órbita dos coelhos difere um tanto da forma da órbita da chinchila e do porquinho-da-índia, que tende a ser mais circular quando comparada à do rato, camundongo e hamster, espécies que apresentam órbitas com aspecto mais ovóide. ^{18, 19}.

Pode-se considerar a órbita dos coelhos como aberta, assim como a dos carnívoros, visto que o processo zigomático do frontal não se articula diretamente com o arco zigomático, constituído pelo processo zigomático do temporal, osso zigomático e processo zigomático do maxilar. A conformação da órbita é semelhante também ao descrito para as órbitas da cutia e de pacas, consideradas incompletas ou abertas ^{20;21}.

A contribuição do osso lacrimal em coelhos, para a margem orbital é pequena, mas relevante devido ao proeminente processo lacrimal. Semelhante ao descrito em ratos, camundongos e hamsters, espécies nas quais a contribuição do osso lacrimal para a formação da margem orbital também é pequena. Entretanto, a comparação do osso lacrimal de coelhos com o osso lacrimal das chinchilas e porquinhos-da-índia evidencia uma grande diferença na contribuição à margem da orbital, pois o osso lacrimal destes animais é bem desenvolvido e participa consideravelmente da sua formação.^{22, 18.}

Os coelhos apresentam a pupila em formato circular quando em midríase, assemelhando-se a maioria dos mamíferos. Já em miose apresentam a pupila em formato oval, semelhante ao observado em capivara ²³, mas diferem do observado em ratos ²⁴ que possuem pupila circular e de chinchilas ¹⁸ e que apresentam pupila em forma de fenda vertical quando em constrição.

Foi observado na margem central da íris, região pupilar, um leve abaulamento, lembrando “entrópio uveal”, sendo essa característica não observada em chinchilas, ratos e capivaras. ^{18, 24, 23}

Na margem da terceira pálpebra foi observada uma leve pigmentação, com presença de pontos circulares elevados no epitélio da conjuntiva em sua face palpebral, com exceção dos coelhos albinos, que apesar de não apresentar pigmento apresentaram os mesmos pontos circulares, sendo essa característica não observada em outras espécies. ^{18, 23}

Algumas espécies de animais como exemplo roedores e aves de rapina^{18, 25} apresentam dois pontos lacrimais uma localizada na região superior da pálpebra e a outra na parte inferior da pálpebra, diferente do que observado na presente investigação na qual os coelhos demonstraram apenas um ponto lacrimal situado na extremidade distal da pálpebra inferior .

O teste de lacrimal de Schirmer (TLS) é um componente importante do exame oftalmológico completo para avaliar a função da glândula lacrimal. O valor médio para o TLS nos coelhos ($6,31 \pm 3,19$ mm/min) na presente investigação pesquisa foi baixo, comparado às observações feitas em elefantes 34,3mm /min²⁶, cães 18,64-23,9 mm/min^{27, 28} gatos 16,92 mm/min e 14,7 mm/min^{28, 29}, cavalos 12,7 mm/min e 18,3 mm/min^{30, 31}, capivaras 14,97mm/min²³ e macacos Rhesus 15,1 mm/min³², mas ainda um pouco maior que o valor médio para TLS do porquinho- da- índia 0,36mm/min³³ e chinchilas 1,07 mm¹⁸. Os valores de coelhos foram semelhantes aos do furão-europeu 5 mm/min³⁴ e dos papagaios 7,9 mm/min³⁵. Em estudos feitos anteriormente em coelhos, o valor médio do TLS foi de $5,30 \pm 2,96$ mm/min³⁶ e de $8,09 \pm 3.40$ mm/min³⁷, demonstrando assim valores semelhantes aos encontrados na presente investigação. Também relatado, nesses estudos, diferenças significativas do TLS relação a algumas raças, sendo essa diferença também observada na presente investigação. Tal diferença encontrada entre as raças, em todos estes estudos, demonstra a importância do conhecimento de valores do TLS normal para diferentes raças de coelhos, já que isso poderia ser um pré requisito para o uso desse teste na prática clínica para diagnóstico de anormalidades oculares em diferentes raças, sendo necessário mais

estudos para avaliar devidamente as diferenças entre coelhos de diferentes raças.

A microbiota bacteriana normal da conjuntiva tem sido pesquisada em uma série de estudos com animais selvagens. Muitos pesquisadores tem demonstrado que bactérias gram-positivas são isolados bacterianos comumente encontrados na superfície ocular normal de diferentes espécies de animais, como cachorros^{38, 39}, furão-europeu³⁴, castores⁴⁰, chinchila¹⁸, macaco-prego⁴¹, capivara²³, gambá⁴², guaxinim^{42, 43} e quati⁴³. Também observado no presente estudo. O gênero *Staphylococcus* foi a bactéria mais isolada e encontrada na superfície ocular. Também foi relatado em um estudo⁴⁴ da microbiota normal de olhos de coelho que esta também foi a bactéria mais comumente isolada. Entre as bactérias gram-negativas, o número de bactérias isoladas era menor quando comparada as gram-positivas. De acordo com estudos,⁴³ bactérias gram-negativas são frequentemente encontradas em olhos saudáveis entre diferentes espécies. Entretanto um número crescente de bactérias gram-negativas pode indicar um estado anormal. Em nossa pesquisa isolados de bactérias gram-negativas não foram correlacionadas com doenças, uma vez que todos os olhos avaliados nesse estudo estavam livres de doença. Sugerindo, então, que estas bactérias poderiam ser transitórias. A bactéria *Pasteurella* isolada de um olho de coelho é encontrada fazendo parte da microbiota nasal e respiratória⁴⁵ e de acordo com os dados obtidos, esse microrganismo não parece fazer parte da microbiota normal dos olhos.

Na medicina veterinária, o estesiômetro de *Cochet-Bonnet* é uma ferramenta bem estabelecida para a determinação da sensibilidade da córnea,

por meio da avaliação da sensibilidade ao toque ou limite da sensibilidade ^{46, 47}. Os resultados da sensibilidade da córnea de coelhos foi similar à avaliação estesiométrica do porquinho- da- índia 2,0 cm ³³, chinchila 1,24 cm ¹⁸ e cavalos 2,2 cm ⁴⁸. Entretanto, nosso estudo apresentou uma diferença significativa em relação à sensibilidade corneana entre raças de coelhos, corroborando com um estudo feito entre raças de coelhos albinos e pigmentados em que estes apresentaram significativas diferença em relação à sensibilidade corneana ⁴⁹. Fato também relatado em outras espécies como cães ⁴⁷ e gatos ⁵⁰ em que houve diferença significativa entre raças.

A avaliação da PIO na presente pesquisa, demonstrou valor médio de $17,39 \pm 3,20$ mmHg, comparado a um trabalho feito em coelhos usando um tonômetro de aplanção (Tono-Pen Avia, Reichert, New York, USA) $15,44 \pm 2,16$ e Tonovet® (Thiols, Helsinki, Finland) $9,51 \pm 2,62$ mmHg ⁵¹ apresentou uma média PIO maior do que as dos coelhos apresentados neste trabalho. Esta diferença pode ser explicada por uma flutuação da PIO durante o dia, ou ainda, pelos tipos de tonômetros que foram utilizados. Em contrapartida comparando com a PIO de outras espécies, apresentou valores semelhantes aos encontrados em chinchilas $17,71 \pm 4,17$ mmHg ¹⁸, e capivaras $16,47 \pm 4,28$ mmHg ²³ e valores maiores que os do furão- europeu $14,5$ mmHg $\pm 3,2$ ³⁴.

A mensuração da espessura central da córnea realizada em coelhos pelo paquímetro ultrassônico foi de $0,38 \pm 0,04$ mm, corroborando um estudo feito anteriormente em coelhos que demonstrou um valor de $0,38 \pm 0,02$ mm ⁵². Comparando com outras espécies foi também semelhante ao resultado demonstrado em chinchilas $0,34 \pm 0,03$ mm ¹⁸. Em contrapartida apresentou um

valor menor que encontrado em capivara $0,483 \pm 0,027$ mm ²³, e um pouco maior que encontrado em furão-europeu $0,33 \pm 0,020$ ³⁴. No presente estudo a córnea de machos foi significativamente mais espessa que a de fêmeas, o que não foi observado nos trabalhos citados acima, demonstrando assim a necessidade de mais estudos comparativos com este teste em relação ao sexo.

Em relação à ultrassonografia de modo B, o comprimento axial do bulbo ocular, o comprimento axial da câmara anterior, o comprimento axial da lente e o comprimento axial da câmara posterior de coelhos são relativamente menores, quando comparado aos das capivaras $22,20 \pm 1,71$ mm, $4,60 \pm 1,35$ mm, $7,41 \pm 0,7$ mm e $10,13 \pm 0,88$ mm ²³ e relativamente maiores quando comparados aos das chinchilas $11,42 \pm 0,64$ mm, $2,01 \pm 0,2$ mm, $5,49 \pm 0,43$ mm e $3,69 \pm 0,52$ mm ¹⁸ respectivamente. Pode-se dizer, portanto, que os olhos dos coelhos em relação ao tamanho encontra-se entre os de capivaras e os de chinchilas. Quando os resultados da presente investigação são comparados a um estudo feito anteriormente em coelhos ⁵³, estes apresentaram dados semelhantes em relação ao comprimento axial do bulbo ocular $17,12$ mm $\pm 0,41$ e comprimento axial da câmara anterior $2,70$ mm $\pm 0,22$ mm, porém em relação ao comprimento axial da lente $7,32$ mm $\pm 0,40$ mm e da câmara posterior $7,10$ mm $\pm 0,45$ mm demonstraram dados discretamente menores.

O conhecimento do diâmetro da fenda palpebral normal é uma informação biométrica que pode auxiliar no diagnóstico de algumas anormalidades de pálpebra superior e inferior, tais como anquilobléfaro, agenesia palpebral,

blefaromiose, euribléfaro, entrópico ou ectrópico contribuindo assim com o cirurgião na restauração da função palpebral de acordo com o correto posicionamento e reconstrução das pálpebras. Assim também, o conhecimento do diâmetro de córnea pode auxiliar no diagnóstico de doenças que afetam o tamanho e a curvatura da córnea, tais como o glaucoma e o ceratocone. No presente estudo o diâmetro palpebral apresentado foi maior do que encontrado em chinchilas $1,44 \pm 0,11\text{cm}$ ¹⁸ . Em relação ao diâmetro de córnea se assemelha ao de seres humanos que apresentam para 11,7mm. ⁵⁴

Os valores de referência e observações morfológicas obtidas em coelhos, nesta pesquisa, poderão auxiliar outros médicos veterinários oftalmologistas no reconhecimento das características morfológicas oftálmicas peculiares nestes animais, assim como, permitir um diagnóstico mais preciso das doenças oculares; uma vez que, além de ser utilizado como modelo experimental para estudos oftalmológicos também é utilizado como animal de companhia.

5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Nowak RM. Walker's Mammals of the World. 6. Ed. Baltimore Johns: Hopkins University Press. 1999; 2: 1715-1720.
2. Brooks DL. Rabbits, hares, and pikas (lagomorpha). In: Fowler ME, editor: Zoo and Wild animal medicine, ed 2, Philadelphia, Saunders. 1986; 727-748.
3. Myers K, Parker BS: A study of the biology of the wild rabbit in climatically different regions in Easter Australia. VI. Changes in numbers and distribution related to climate and land systems in semiarid North – western New South Wales, Aust Wildl Res. 1975; 2: 11-32.

4. Bays TB. Comportamento de coelhos. In: Bays T.B. et al. Comportamento de animais exóticos de companhia. 1. ed. São Paulo: Roca. 2009; 1: 1-41.
5. Carpenter JW. Lagomorpha (Pikas, Rabbits and Hares). In: Fowler MR, Miller RE. Zoo and Wild Animal Medicine. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 2003;410-419.
6. Quinton JF. Novos animais de estimação – pequenos mamíferos. São Paulo: Roca. 2005; 263.
7. Vennen KM, Mitchell MA. Rabbits. In: Mitchell, M.A.; TULLY Jr TN. Manual of exotic pet practice. St. Louis: Saunders Elsevier. 2009; 14: 375-405.
8. O'Malley B. Clinical anatomy and physiology of exotic species. O'Malley B. Rabbits. 1.ed. Edinburgh: Elsevier. 2005; 8: 174-195.
9. Bradley TA: Rabbits: medical implications of selected abnormal behaviors, Exotic DVM Magazine. 2000; 2 (4): 27-31.
10. Diesem CD. The bony orbit: bones, foramina, processes. In: PRINCE, J. H. The rabbit in eye research. Charles C. Thomas Publisher, Illinois. 1964; 5-27.
11. Eglitis I. The orbital contents: fascia, conjunctiva. In: PRINCE, J. H. The rabbit in eye research. Charles C. Thomas Publisher, Illinois. 1964; 28-37.
12. Popesko P, Rajtová V, Horák J. A color atlas of anatomy of small laboratory animals: Vol. 1, rabbit and guinea pig. W. B. Saunders, Philadelphia. 2003; 18-44.
13. Ruskell GL. Vascular and neurological systems: blood vessels of the orbit and globe. In: PRINCE, J. H. The rabbit in eye research. Charles C. Thomas Publisher, Illinois. 1964a; 514-553
14. Ruskell GL. Vascular and neurological systems: neurology of the orbit and globe. In: PRINCE, J. H. The rabbit in eye research. Charles C. Thomas Publisher, Illinois. 1964b; 554-579.
15. Prince JH, Eglitis I. The orbital contents: muscles. In: PRINCE, J. H. The rabbit in eye research. Charles C. Thomas Publisher, Illinois. 1964; 57-71.
16. Lewis JR, Reiter AM. Anatomy and physiology: rodent and lagomorph dental anatomy. In: NIEMIEC, B. A. Small animal dental, oral & maxillofacial disease, a color handbook. Manson Publishing Ltd, London. 2010; 13-13.

17. Jenkins J.R. Clinical pathology. In: Meredith A, Flecknell P. *BSAVA Manual of Rabbit Medicine and Surgery* (2ed. Keeble E, Meredith A). British Small animal Veterinary Association, Quedgeley, Gloucester, 2006, p.103-108.
18. Lima L, Montiani-Ferreira F, Tramontin M, Leigue Dos Santos L, Machado M, Ribas Lange R, Helena Abil Russ H. The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. *Veterinary Ophthalmology*. 2010; 13: 14-25
19. Montiani-Ferreira F. Rodents: ophthalmology. In: *BSAVA Manual of Rodents and Ferrets*, (ed. Keeble E, Meredith A.) British Small animal Veterinary Association, Quedgeley, Gloucester, 2009; 15: 169-180.
20. Oliveira FS, Martins LL , Pauloni AP, *et al.* Descrição Anátomo-Radiográfica do Esqueleto Axial da Cutia (*Dasyprocta azarae*, LICHTENSTEIN, 1823). *ARS Veterinária*. 2009; 25(1): 024- 027.
21. Oliveira FS, Canola JC, Machado MRF, *et al.* Descrição anátomoradiográfica do esqueleto axial da paca (Agouti paca, Linnaeus, 1766). *Acta Scientiae Veterinariae*. 2006; 34 (3): 331-334.
22. Wesche P. Rodents: clinical pathology. In: *BSAVA Manual of Rodents and Ferrets*, (ed. Keeble E, Meredith A.) British Small animal Veterinary Association, Quedgeley, Gloucester, 2009; 4: 42-51.
23. Montiani-Ferreira F, Truppel J, Tramontin MH, D'Octaviano Vilani R, Lange RR. The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. *Veterinary Ophthalmology*. 2008a; 11: 386–394.
24. Heywood R. Some clinical observations on the eyes of sprague-dawley rats. *Laboratory Animals*. 1973; 7: 19-27.
25. TJ. Exotic animal ophthalmology. In K.N. Gelatt, ed., *Veterinary Ophthalmology*. Philadelphia, Lippincott Williams e Wilkins. 1999; 1273-1305.
26. Tuntivanich P, Soontornvipart K, Tuntivanich N, Wongaumnaykul S, Briksawan P. Schirmer tear test in clinically normal Asian elephants. *Veterinary Research Communications*. 2002 ;26(4):297-9.
27. Gelatt KN, Peiffer RL Jr, Erickson JL *et al.* Evaluation of the tear formation in the dog, using a modification of the Schirmer tear test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1975; 166:368–370.

28. Margadant DL, Kirby K, Andrew SE *et al.* Effect of topical tropicamide on tear production as measured by Schirmer's tear test in normal dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology*. 2003; 6: 315–320.
29. Veith LA, Cure TH, Gelatt KN. The Schirmer tear test in cats. *Modern Veterinary Practice*. 1970; 51: 48–49.
30. Marts BS, Bryan GM, Prieur DJ. Schirmer tear test measurement and lysozyme concentration of equine tears. *Journal of Equine Medicine and Surgery*. 1997; 1: 427–430.
31. Brooks DE, Clark CK, Lester GD. Cochet-Bonnet a esthesiometer determined corneal sensitivity in neonatal foals and adult horses. *Veterinary Ophthalmology* 2000; 3: 133–137.
32. Jaax GP, Graham RR, Rozmiarek H. The Schirmer tear test in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Laboratory Animal Science*. 1984; 34(3): 293-294.
33. Trost K, Skalichy M, Nell B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Veterinary Ophthalmology* 2007; 10: 143-146.
34. Montiani-Ferreira F, Mattos BC, Russ HHA. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Ophthalmology* 2006; 9: 209–213.
35. Storey ES, Carboni DA, Tully TN. Phenol red thread tear test and Schirmer tear test in Amazon parrots (Abstract): 35th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists 2004. *Veterinary Ophthalmology* 2004; 7: 437–453.
36. Abrams KL, Brooks DE, Funk RS, Theran P. Evaluation of the Schirmer tear test in clinically normal rabbits. *American Journal of Veterinary Research*. 1990; 51(12): 1912-1913.
37. Yilmaz K, Fahrettin A, Cafer T. Schirmer Tear Test in Different Rabbit Breeds. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*. 2005; 15, 2: 1–5
38. Gerding PA, Kakoma I. Microbiology of the canine and feline eye. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1990; 20: 615-625
39. Prado MR, ROCHA MFG, BRITO EHS, *et al.* Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs

- with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceara, Brazil. *Veterinary Ophthalmology*. 2005; 8 (1): 33-37.
40. Cullen CL. Normal ocular features, conjunctival microflora and intraocular pressure in the Canadian beaver (*Castor canadensis*). *Veterinary Ophthalmology*. 2003; 6: 279–284.
 41. Montiani-Ferreira F, Shaw G, Mattos BC, *et al*. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*). *Veterinary Ophthalmology*. 2008b; 11(3): 197-201.
 42. Pinard CL, Brightman AH, YEARY TJ, *et al*. Normal conjunctival flora in the North American opossum (*Didelphis virginiana*) and raccoon (*Procyon lotor*). *Journal of Wildlife Diseases*. 2002; 38(4): 851-855.
 43. Spinelli TP, Oliveira-Filho EF, Silva D, *et al*. Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in Pernambuco and Paraíba (Northeast, Brazil). *Veterinary Ophthalmology*. 2010; 13 (Supplement 1), 134-136.
 44. Cooper SC, Mclellan GJ, Rycroft AN. Conjunctival flora observed in 70 healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Record*. 2001; 149: 232–235.
 45. Duclos P, Caillet J, Javelot P. Aerobic bacterial flora of the nasal cavity of farmed rabbits. *Annales de Recherches Vétérinaires*. 1986; 17(2): 185-190.
 46. Chan-Ling T. Sensitivity and neural organization of the cat cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1989; 30: 1075–1082.
 47. Barrett PM, Scagliotti RH, Merideth RE *et al*. Absolute corneal sensitivity and corneal trigeminal nerve anatomy in normal dogs. *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology*. 1991; 1: 245–254.
 48. Kaps S, Richter M, Spiess BM. Corneal esthesiometry in the healthy horse. *Veterinary Ophthalmology*. 2003; 6: 151–155.
 49. Millodot M, Lim CH, Ruskell GL. A comparison of corneal sensitivity and nerve density in albino and pigmented rabbits. *Ophthalmic Research*. 1978; 10: 307–311.

50. Blocker T, Van Der Woerdt A. A comparison of corneal sensitivity between brachycephalic and Domestic Short-haired cats. *Veterinary Ophthalmology*. 2001; 4(2): 127-130.
51. Pereira FQ, Bercht BS, Gomes Soares MG, et al. Comparison of a rebound and an applanation tonometer for measuring intraocular pressure in normal rabbits. *Veterinary Ophthalmology*. 2011; 14(5): 321–326.
52. Sailstad DM, PEIFFER RL Jr. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Laboratory Animals*. 1981; 15 (4): 393-395 393.
53. Toni MC, Meirelles AEWB, Gava FG, et al. Rabbits' eye globe sonographic biometry. *Veterinary Ophthalmology*. 2010; 13(6): 384–386.
54. Ho CL, Walton DS. Primary megalocornea: clinical features for differentiation from infantile glaucoma. *Journal of Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. 2004; 41(1):11-7.

6. Capítulo 4 - O OLHO DO CARCARÁ (*Caracara plancus*): OBSERVAÇÕES MORFOLÓGICAS, ACHADOS ECOBIOMÉTRICOS E VALORES DE REFERÊNCIA PARA TESTES SELECIONADOS DE DIAGNÓSTICO OFTÁLMICO

6.1 RESUMO

Objetivo: O presente estudo tem como objetivo realizar investigação descritiva das características morfológicas mais relevantes do olho do Carcará (*Caracara plancus*), assim como, realizar testes de diagnóstico oftálmico e com isso estabelecer valores de referência que poderão servir como parâmetros para a espécie.

Método: Foram realizadas observações morfológicas do bulbo ocular e anexos, além de parâmetros oftálmicos e testes selecionados: teste lacrimal de Schirmer (TLS), cultura da microbiota bacteriana normal da conjuntiva, estesiometria, pressão intraocular (PIO), espessura de córnea central (ECC), ecobiometria ocular em modo-B, mensurações do comprimento da fissura palpebral e do diâmetro corneano em 19 carcarás saudáveis.

Resultados e Discussão: Os valores de referência para os testes oftálmicos foram: TLS: $7,83 \pm 3,05$ mm/min; estesiometria: $2,46 \pm 1,10$ cm; PIO: $19,18 \pm 3,07$ mmHg; ECC: $0,29 \pm 0,03$ mm; profundidade da câmara anterior: $0,27 \pm 0,056$ mm, diâmetro axial da lente: $0,455 \pm 0,05$ mm, profundidade da câmara vítrea: $1,14 \pm 0,11$ mm, comprimento axial do bulbo ocular: $1,90 \pm 0,06$ cm; diâmetro da fenda palpebral: $13,32 \pm 1,06$ cm; diâmetro da córnea: $10,26 \pm 2,43$ cm. As bactérias mais frequentemente isoladas da conjuntiva foram

Corynebacterium sp. (23%) seguida pelo *Staphylococcus aureus* (21%) e *Streptococcus* sp. Os valores de referência e observações morfológicas obtidas nesta pesquisa poderão auxiliar outros médicos veterinários oftalmologistas no reconhecimento das características morfológicas oftálmicas peculiares dos carcarás, permitindo assim um diagnóstico mais preciso das doenças oculares em animais desta espécie.

Palavras-chave: *caracara plancus*; microbiota normal, paquímetro ultrassônico, pressão intra-ocular, estesiometria, ultrassonografia, morfologia

6.2 ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to conduct research detailing the most relevant morphological characteristics of Caracara's eye (*Caracara plancus*), as well as realize ophthalmic diagnostic tests and establish normal values, which could serve as a reference for the species.

Method: We performed morphological observations of the eye and adnexa, besides ophthalmic parameters and selected tests: Schirmer tear test (TLS), culture of normal bacterial flora of the conjunctiva, esthesiometry, intraocular pressure (IOP), central corneal thickness (ECC), ocular biometry B-mode, measurements of the palpebral fissure and corneal diameter in 19 healthy Falcons.

Results and Discussion: The normal range for ophthalmic tests were: TLS: 7.83 ± 3.05 mm / min; esthesiometry: 2.46 ± 1.10 cm; IOP: 19.18 ± 3.07 mmHg; ECC: 0.29 ± 0.03 mm, anterior chamber depth: 0.27 ± 0.056 mm, axial length of

the lens: 0.455 ± 0.05 mm, vitreous chamber depth = 1.14 ± 0.11 mm, axial length eyeball: 1.90 ± 0.06 cm, diameter of the palpebral fissure: 13.32 ± 1.06 cm, diameter of the cornea: $10, 26 \pm 2, 43$ cm. The bacterias most frequently isolated from the conjunctiva were *Corynebacterium* sp. (23%), followed by *Staphylococcus aureus* (21%) and *Streptococcus* sp. There was a significant difference between ages on the esthesiometry test $P = 0.002$ and intraocular pressure $P = 0.001$. Occurring also a significant difference between sex tests in diameter eyelid $P = 0.04$ and $P = 0.018$ corneal diameter. The reference values and morphological observations obtained in this research may help other veterinarians in the recognition of ophthalmic peculiar morphology of the Falcons, allowing a more accurate diagnosis of eye diseases in animals of this species.

Key-words: caracara plancus; normal microbiota, ultrasonic pachymetry, intraocular pressure, esthesiometry, ultrasound morphology

6.3 INTRODUÇÃO

O carcará (*Caracara plancus*) também conhecido como carancho ou caracara, da ordem Falconiformes, família *Falconidae*, é uma ave de rapina onívora campestre que habita todo o território brasileiro desde campos abertos, cerrados e até beiras de estradas e cidades. Sua alimentação é constituída de frutas, detritos, cadáveres, aves vivas, anelídeos e anfíbios ^{1,2}. A anatomia mais do que a dieta define um rapinante, sendo características dessas aves, os bicos e patas especialmente adaptados para caça ³. Seu comprimento varia de 50 a 60 cm e sua envergadura chega a 123 cm, tendo patas alongadas e de

cor amarela. Possui uma plumagem preta na parte superior, e o peito é uma combinação de marrom - claro com riscas preta- rajadas, sendo esse padrão de riscas nos animais jovens, longitudinais. Possuem manchas de cor clara nas pontas das asas, e tem também como principal característica a cabeça clara, com um penacho negro em forma de “topete”, a pele nua em volta da narina, de cor vermelho a carmim, podendo passar essa cor da pele de vermelho para amarelo quando a ave se excita, não sendo essa característica considerada um dimorfismo sexual ^{4, 5}.

Não foram encontradas publicações específicas sobre oftalmologia em carcarás relacionados à morfologia ocular, parâmetros oftálmicos e valores de referência para testes diagnósticos. Uma vez que a oftalmologia tornou-se parte importante na medicina aviária, conhecimentos sobre peculiaridades anatômicas e fisiológicas dos olhos desta espécie pode ajudar na interpretação e diagnóstico de doenças oculares nessas aves. O presente estudo teve como objetivo detalhar as observações feitas no olho de carcarás, caracterizando a morfologia ocular e estabelecendo parâmetros oftálmicos de referência para teste diagnóstico tais como, o TLS, microbiologia, estesiometria, tonometria, paquimetria, Biometria Ultrassonográfica, diâmetro de pálpebra e de córnea, assim gerando valores de referência para futuras pesquisas.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 19 carcarás (*Caracara plancus*), sendo 15 adultos e 4 jovens. Já que os animais eram de vida livre, não foi informada a idade exata

de cada exemplar. Estes pesavam entre 0,350 gramas a 1,325 kg. Destes, sete eram fêmeas; seis, machos; e os outros seis, o sexo não foi determinado. Os animais foram selecionados aleatoriamente no Centro de triagem de animais Silvestres - Cetas da Pontifícia Universidade Católica, PR, PUCPR/IBAMA, localizada em Tijucas do Sul, Paraná, Brasil; do Guira-Oga Centro de recuperação e reprodução de animais na selva Paranaense, localizado próximo de Foz do Iguaçu, na cidade fronteiriça de Puerto Iguazú, na Argentina; no Zoológico Ribas Lange, Criadouro de Animais Silvestres e Hospital Veterinário da ITAIPU; e no Parque Ecológico Ouro Fino Campo Largo - Paraná.

Todo o experimento foi baseado nos critérios preconizados nas “Normas para uso de animais em pesquisas oftalmológicas” da ARVO (*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*).

Os animais foram submetidos a exame físico para excluir animais com sinais de doença sistêmica. Posteriormente, procedeu-se o exame oftálmico dos animais, pela mesma equipe de pesquisadores. Os testes oftálmicos foram realizados por diferentes avaliadores, porém, para evitar uma discrepância de como cada teste é feito por diferentes pessoas, o mesmo avaliador que realizou um determinado teste, passou a sempre fazê-lo durante toda a investigação.

6.3.1 Exames oftálmicos

Após a contenção física, utilizando luvas de couro (para evitar possíveis lesões pelas garras do animal no examinador), os membros pélvicos foram contidos. As asas foram então recolhidas e seguras com a mesma mão que continha os membros pélvicos, no intuito de não ocorrer fraturas das asas ou quebra das penas, gerando o mínimo de estresse possível na ave, no momento em que os testes oftálmicos eram realizados. Durante todo o exame, cada ave foi mantida na posição vertical, enquanto a cabeça era manualmente estabilizada, tomando cuidado para não realizar compressão sobre a região do pescoço.

As aves foram submetidas ao exame oftálmico, que incluiu inspeção ocular, avaliação do segmento anterior do bulbo ocular, teste lacrimal de Schirmer (TLS)ⁱ, coleta de material para cultura e análise bacteriológica, estesiometria^j, biomicroscopia com lâmpada de fenda^k, documentação fotográfica digital^l, tonometria digital de aplanção^m, paquimetria central de córnea (paquímetro ultrassônico)ⁿ; ultrassonografia do bulbo ocular de modo-

ⁱ Teste Lacrimal de Schirmer, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda.

^j *Cochet-Bonnet (Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, France).*

^k *Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, France.*

^l Máquina fotográfica, Sony Cybershot, DSC- W80, Câmera Digital com 3x Zoom Óptico.

^m Tonopen XL, Mentor Medical Systems.

ⁿ Paquímetro ultrassônico (*Micropach® Sonomed, Model 200P+, Lake Success, NY, USA*).

B^o., mensuração do comprimento da fissura palpebral^p e do diâmetro da córnea.

6.3.2 Inspeção Ocular

Para avaliação das estruturas oculares do segmento anterior de 38 olhos de 19 carcarás (*Caracara plancus*), foi realizada iluminação direta utilizando um transiluminador de Finoff¹ e biomicroscópio com lâmpada de fenda (Hawk Eye, Dioptrix, L'Union, France).

6.3.3 Teste Lacrimal de Schirmer (TLS)

Posteriormente, em ambos os olhos, dos 19 carcarás, procedeu-se o teste lacrimal de Schirmer tipo 1 (TLS) (**Figura 20 A**), o qual mensura a produção basal e parte da produção reflexa da fração aquosa do filme lacrimal. Esta mensuração foi obtida antes da instilação de qualquer colírio anestésico para que assim fosse evitada qualquer influência nos resultados. Para realização do teste foram utilizadas tiras milimetradas de papel estéril de TLS padronizadas para o TLS (Teste Lacrimal de Schirmer, Ophthalmos Ind. Com. Produtos Farmacêuticos Ltda, SP). As fitas foram acondicionadas

^o Sonix OP Smart Ultrasound System.

^p Paquímetro de aço inoxidável (Neiko Tools, Klamath Falls, Oregon, USA).

individualmente por um minuto, no interior do saco conjuntival de ambos os olhos.

6.3.4 Análise microbiológica

A colheita das amostras foi realizada por meio de fricção gentil de zaragatoa estéril junto à margem palpebral interna, superfície ocular (córnea e conjuntiva bulbar) e conjuntiva palpebral de cada olho (**Figura 20 B**), perfazendo um total de 28 olhos (amostras) de 14 carcarás. A colheita foi feita com luva de estéril e tomou-se o devido cuidado para que a zaragatoa não tocasse os cílios e pálpebras tentando assim, evitar ao máximo a contaminação externa. Também foi realizada sem a administração de anestésico tópico, pois a utilização deste fármaco poderia interferir no crescimento de micro-organismos. Em seguida, as zaragatoas eram colocadas em meio de transporte e armazenadas sob refrigeração, para posteriormente serem enviadas ao laboratório de microbiologia, a fim de identificar a microbiota residente. As culturas dos micro-organismos foram realizadas em placas com meio BHI (*brain-heart infusion*) e ágar sangue (sangue de carneiro 5%) e MacConkey, as quais permaneceram incubadas a 37°C em ambiente aeróbico durante 24 a 48 horas. As colônias bacterianas obtidas foram identificadas por coloração de Gram e procedimentos padrão de avaliação.

6.3.5 Estesiometria

A sensibilidade da córnea foi avaliada, utilizando-se o estesiômetro de Cochet-Bonnet (Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, France) (Figura 20 C), em 32 olhos de 16 carcarás. A mensuração foi realizada tocando o monofilamento de náilon perpendicularmente sobre a superfície central da córnea, por cinco vezes, em um mesmo comprimento de fio, sendo que o principal reflexo observado foi o piscar do animal. Para tanto, definiu-se previamente o diâmetro inicial do monofilamento de náilon, variando-se o diâmetro de comprimento do fio durante o exame. Ou seja, caso o animal não apresentasse o estímulo, o valor do comprimento do filamento era reduzido em 5 mm. A avaliação do teste permite comparar o comprimento de fio necessário para causar a resposta ao estímulo (mensurado em mm), com a sensibilidade da área central corneana.

6.3.6 Pressão intra-ocular (PIO)

Em 34 olhos de 17 carcarás, foi realizada instilação de anestésico tópico estéril (cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%, solução oftálmica, Laboratório Allergan®, Guarulhos, São Paulo, Brasil). Logo após, foi utilizado o tonômetro de aplanção (Tonopen XL, Mentor, Norwell, MA, USA) para mensuração da pressão intra - ocular (Figura 20 D). Nesta etapa do estudo, o avaliador atentou-se por não realizar nenhuma pressão na região cervical do animal, evitando assim possível alteração na mensuração final da PIO. O instrumento foi posicionado perpendicularmente à córnea, tocando-a

suavemente. O resultado final obtido representa uma média, com variação de 5%, entre três mensurações consecutivas.

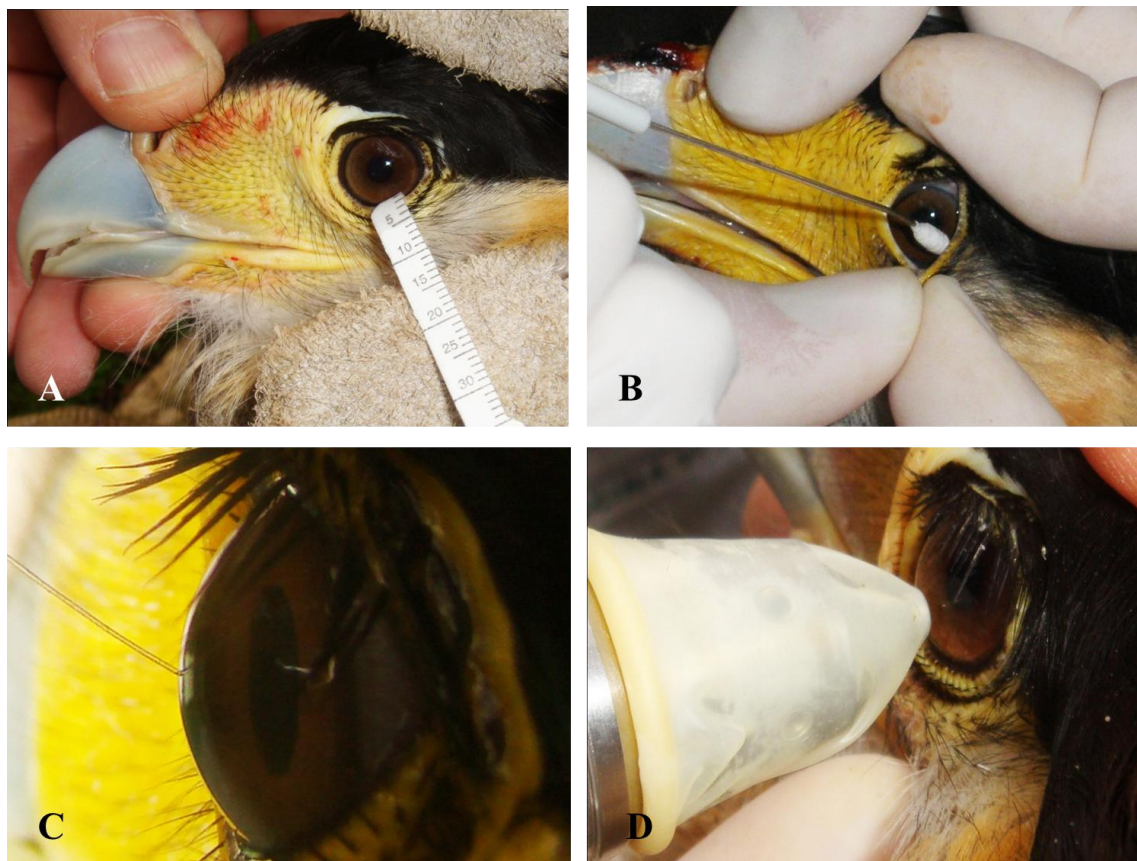


Figura 20 - Sequência fotográfica de parte dos testes oculares realizados nos carcarás. A: Teste lacrimal de Schirmer; B: Coleta de amostra de conjuntiva; C: Análise estesiométrica da córnea central; D: Mensuração da PIO.

6.3.7 Paquimetria central de córnea

O exame de paquimetria corneana foi realizado em 26 olhos de 13 carcarás, utilizando-se um paquímetro ultrassônico (Micropach® Sonomed, Model 200P+, Lake Success, NY, USA), que apresentava a velocidade de som na córnea pré-estabelecida em 1640m/s (Figura 21 A) para medir a espessura central da córnea (ECC). Foram feitas três mensurações consecutivas. Previamente ao exame, foi realizada instilação de colírio anestésico tópico estéril (cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%%; Laboratório Allergan, Guarulhos, São Paulo, Brasil).

6.3.8 Biometria ultrassonográfica em modo-B

O exame ultrassonográfico foi realizado em 14 olhos de 7 carcarás. Para realização deste exame, foi utilizado o aparelho (*Sonix OP Smart Ultrasound System, Canada*), com transdutor linear de 14-MHz. Foi instilada 1 gota de anestésico tópico estéril (cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%, Laboratório Allergan, Guarulhos, São Paulo, Brasil). Em seguida, aplicou-se gel acústico de transmissão (*Aquasonic-100, Parker Laboratories Inc., Fairfield, NJ*), e então, o transdutor foi posicionado perpendicularmente sobre a superfície corneana da ave, sem que a terceira pálpebra estivesse a recobrindo (Figura 21 B). A captura das imagens deu-se no momento em que a superfície corneana e a parede posterior do bulbo ocular puderam ser claramente identificadas. As imagens foram obtidas a partir de

cortes sagitais e dorsais e então, as mensurações ecobiométricas foram realizadas.

6.3.9 Diâmetro da fenda palpebral e diâmetro de córnea

Para mensuração da fenda palpebral e do diâmetro de corneano de 38 olhos de 19 carcarás utilizou-se um paquímetro de aço inoxidável digital com visor de LCD e precisão de $\pm 0,02$ mm (Neiko Tools, Klamath Falls, Oregon, *USA*) Procedeu-se da seguinte forma: Para mensuração do diâmetro da fenda palpebral uma das extremidades do paquímetro foi posicionada sobre o canto nasal da margem palpebral, e a outra extremidade, no canto temporal da margem palpebral (Figura 21 C). Já para a aferição do diâmetro da córnea, ambas as extremidades do paquímetro foram posicionadas sobre o limbo do bulbo ocular (Figura 21 D).

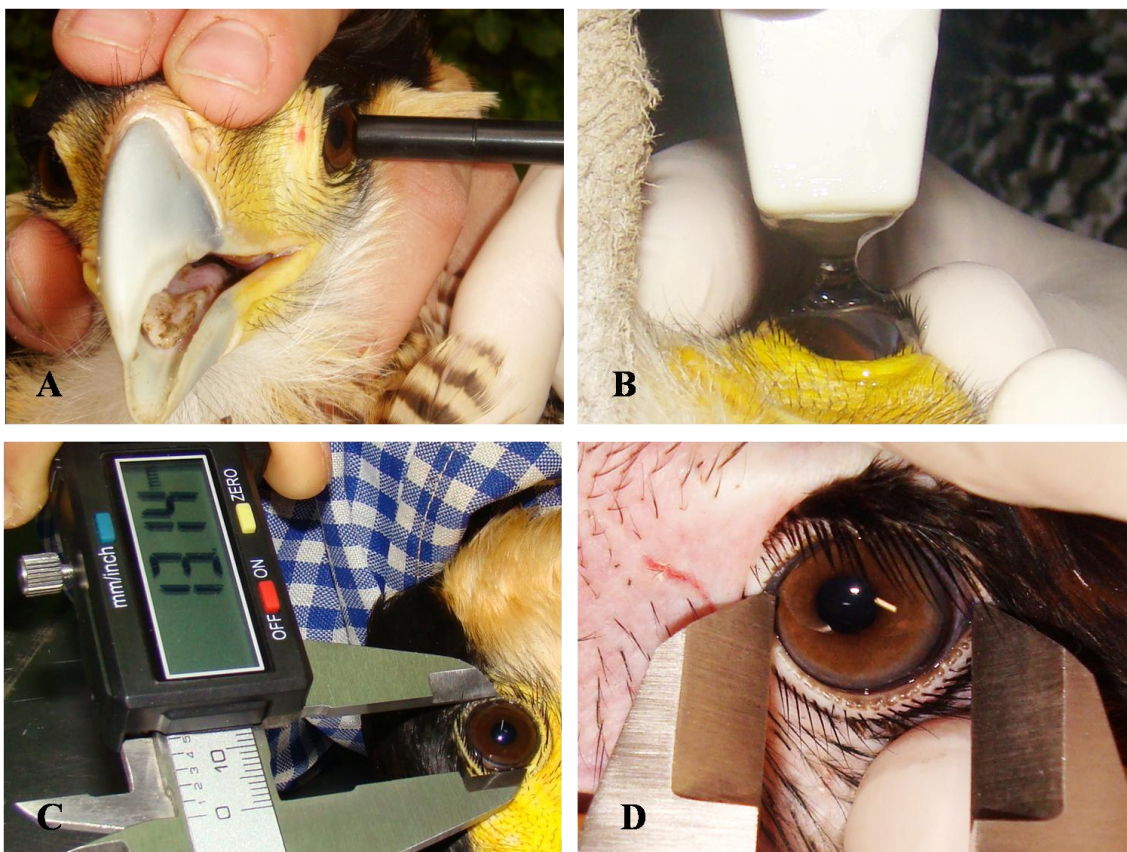


Figura 21 - Sequência fotográfica de parte dos testes oculares realizados nos carcarás. A: Paquimetria de córnea; B: Ultrassom ocular; C: Mensuração do diâmetro da rima palpebral; D: Mensuração do diâmetro da córnea.

6.5 Análise estatística

Quando aplicável, foram realizadas análises estatísticas sob os testes, incluindo uma análise de estatística descritiva completa, Teste-*t* (quando houve comparação entre dois grupos de dados), Teste Exato de Fisher (para comparação de proporções) e teste de correlação de Bartlett (para comparar variáveis contínuas numéricas) utilizando o software JMP, versão 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão e foram considerados significativos quando o valor de $P < 0,05$.

6.6 RESULTADOS

6.5.1 Observações gerais nos animais vivos

Todos os 19 animais apresentavam-se saudáveis quanto ao exame físico e oftálmico. Destes 31% eram machos; 36% eram fêmeas e 31% não foram relatados o sexo; 21% eram jovens e 78% eram adultos. O peso médio encontrado foi de $1,04 \pm 0,26$ kg.

Foi observado que as fêmeas deste estudo eram mais pesadas do que os machos, ou seja, as fêmeas apresentaram peso médio de $1,189 \pm 0,146$ kg e os machos $0,978 \pm 0,232$ kg. Neste quesito, houve diferença significativamente maior entre as fêmeas em relação aos machos comparando aos valores médios do peso ($P=0,035$). Contudo, avaliando a idade dos animais com o peso médio, não houve diferença significativa entre eles ($P=0,52$).

A (Tabela 8) contém os resultados das análises estatísticas descritivas dos testes oftálmicos dos carcarás.

Tabela 8-Resultados obtidos para os testes de diagnóstico oftalmológicos e achados ecobiométricos do olho de carcarás (*Caracara plancus*).

| Exames Oftálmicos | Nº carcarás | Nº de olhos | Média | Mediana | DesvPad* | CV** |
|--|-------------|-------------|--------|---------|----------|-------|
| Teste lacrimal de <i>Schirmer</i> (mm/min) | 19 | 38 | 7,838 | 8 | 3,051 | 0,389 |
| Pressão intra-ocular (mmHg) | 17 | 34 | 19,182 | 19 | 3,066 | 0,16 |
| Estesiometria (cm) | 16 | 32 | 2,468 | 2,5 | 1,103 | 0,44 |
| Diâmetro da fenda palpebral (mm) | 19 | 38 | 13,321 | 13,14 | 1,062 | 0,08 |
| Diâmetro da córnea (mm) | 19 | 38 | 10,264 | 11,19 | 2,434 | 0,23 |
| Espessura da córnea central (mm) | 13 | 26 | 0,297 | 0,301 | 0,03 | 0,1 |
| Comprimento axial do bulbo ocular (cm) | 7 | 14 | 1,898 | 1,885 | 0,062 | 0,033 |
| Profundidade da câmara anterior (cm) | 7 | 14 | 0,27 | 0,45 | 0,056 | 0,12 |
| Diâmetro da lente (cm) | 7 | 14 | 0,455 | 0,45 | 0,056 | 0,12 |
| Profundidade da câmara vítrea (cm) | 7 | 14 | 1,144 | 1,11 | 0,114 | 0,1 |

DesvPad* = desvio padrão

CV** = coeficiente de variação

4

6.5.2 Observações da morfologia ocular externa em animais vivos

No exame oftálmico, observou-se que os olhos dos carcarás apresentavam-se posicionados em um eixo visual divergente. Assim o campo visual total é de quase 360°, com uma margem (gama) de estereopsia de 0° a 70°. As pálpebras destes animais são relativamente móveis, sendo que a inferior comparada com a superior apresenta maior mobilidade. As margens palpebrais podem conter ainda uma leve pigmentação, que pode variar individualmente entre os animais. Foi observada ainda a presença de filoplumas (cílios modificados), espessos e longos na pálpebra superior, e na inferior, cílios mais delgados, curtos e em menor quantidade que na pálpebra superior (Figura 22).



Figura 22 - Fotografia do olho esquerdo de um carcará. Observe as margens palpebrais com uma leve pigmentação e a presença de filoplumas (cílios modificados), espessos e longos na pálpebra superior, e na inferior, cílios mais delgados, curtos e em menor quantidade que na pálpebra superior.

A terceira pálpebra é bem desenvolvida e móvel, localizada no canto nasal do bulbo ocular, movendo-se em direção nasotemporal. Suas margens podem conter pigmentação. No entanto, o corpo da membrana apresenta relativa transparência e presença de vasos, podendo assim, visualizar a íris do paciente. (Figura 23 e Figura 24) Nestes animais, a fissura palpebral é larga. Mas em decorrência do diâmetro corneano ser grande ao exame ocular externo, não é possível observar a esclera do paciente, ao menos que se levante manualmente a pálpebra superior e inferior. Apresentam pontos nasolacrimais tanto na pálpebra superior quanto na inferior. A íris pode apresentar diferentes graus de pigmentação variando entre o castanho- escuro

e castanho-claro, independente da idade e do sexo. A pupila possui formato circular e movimento voluntário.

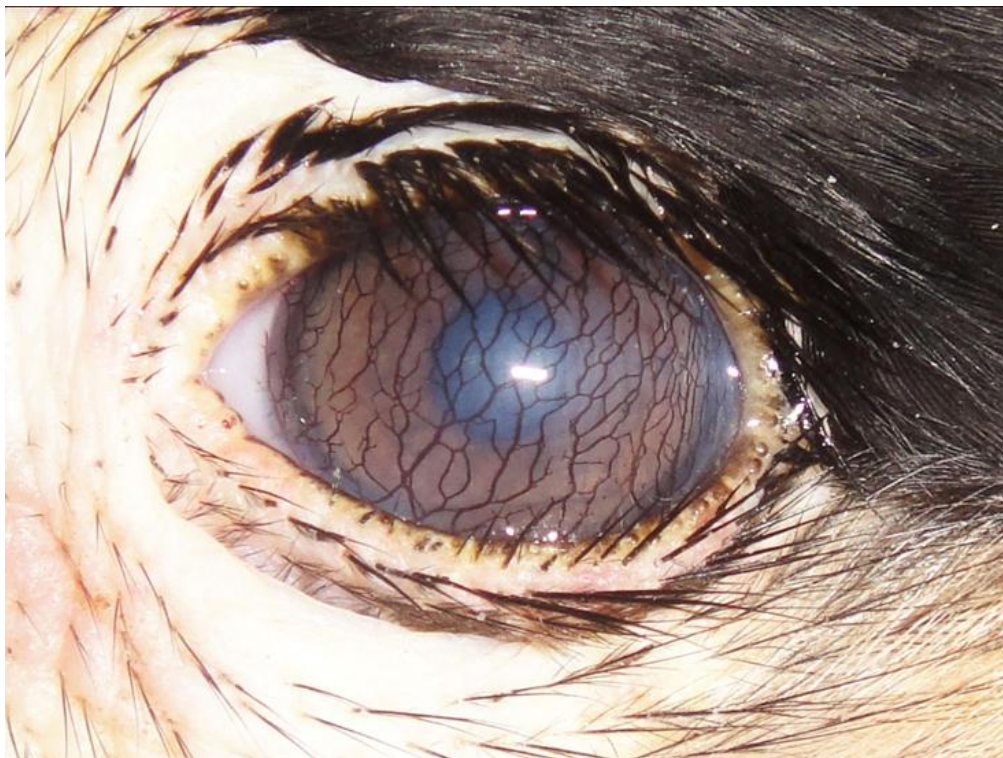


Figura 23 - Imagem da terceira pálpebra. Observe que a terceira pálpebra apresenta relativa transparência e presença de inúmeros vasos, podendo assim, visualizar a íris do paciente.

6.5.3 Teste lacrimal de Schirmer (TLS)

Os resultados médios do teste lacrimal de Schirmer, encontrados em 38 olhos de 19 animais foram $7,84 \pm 3,05\text{mm/min}$. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas ($P= 0,86$), entre olho direito ou esquerdo ($P=0,33$) e nem entre animais adultos ou jovens ($P=0,67$).

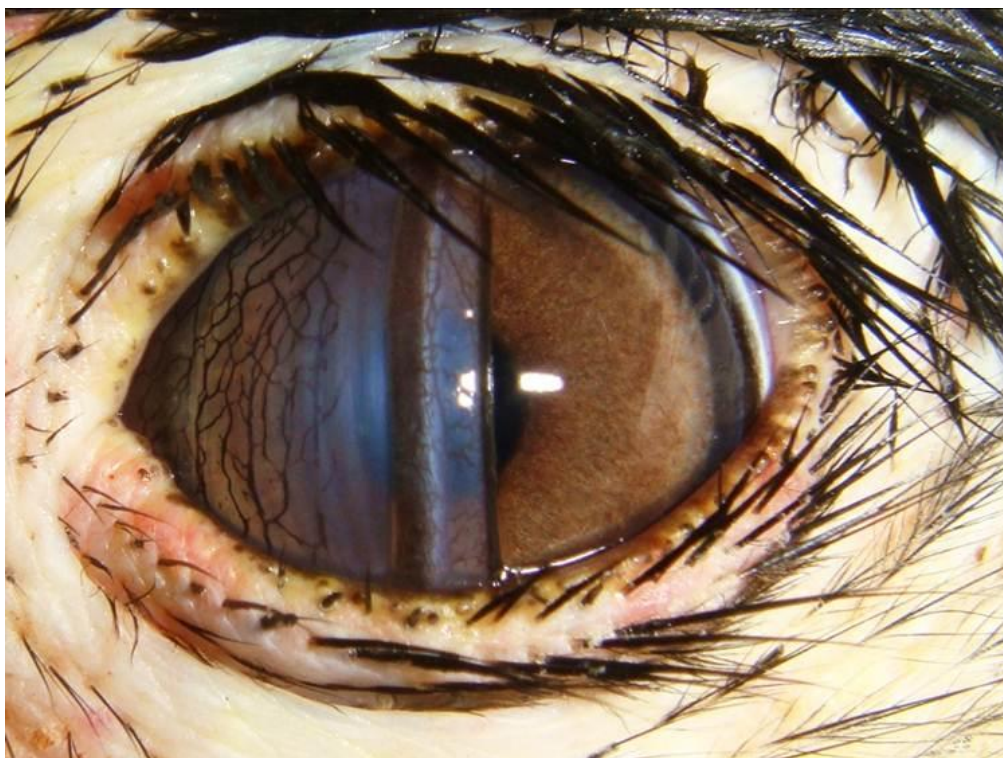


Figura 24 - Imagem da terceira pálpebra. Observe que a terceira pálpebra é bem desenvolvida e móvel, localizada no canto nasal do bulbo ocular, movendo-se em direção nasotemporal.

6.5.4 Análise Microbiológica

Foram identificados organismos bacterianos nas em 29 das 33 amostras microbiológicas coletadas. A (Tabela 9) contém os resultados condensados das análises microbiológicas. Os resultados da cultura demonstraram crescimento bacteriano em 87% (29 olhos).

Do total de olhos analisados, foram encontrados 15 (44%) com apenas um tipo de bactéria isolada, 12 (35%) com dois tipos diferentes de espécies de

bactérias isoladas e 4 (12%) com três tipos diferentes de bactérias identificadas.

Foram observados 42 isolados no total, dos quais 31(73%) foram classificados como Gram-positivos e 11 (26%) como Gram-negativos. As bactérias encontradas na microbiota da conjuntiva dos carcarás (**Tabela 9**) incluem: *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterobacter* sp., BGNNF, *Neisseria* sp. e *Escherichia coli*. As bactérias mais frequentes nas análises foram *Corynebacterium* sp. (23%) seguida pelo *Staphylococcus aureus* (21%) e *Streptococcus* sp.

Tabela 9 - Frequência de bactérias isoladas nos olhos dos carcarás.

| Tipo de Bactéria | carcarás (%) | |
|--------------------------------|---------------------|------|
| GRAM-POSITIVA | 31 | 73 |
| Staphylococcus sp. | 9 | 21 |
| SCP | 4 | 9.5 |
| SCN | 5 | 11 |
| Micrococcus sp. | 1 | 2.3 |
| Streptococcus sp. | 7 | 16 |
| Bacillus sp. | 4 | 9.5 |
| Corynebacterium sp. | 10 | 23.8 |
| GRAM-NEGATIVA | 11 | 26 |
| Enterobacteria | 9 | 21 |
| <i>E. coli</i> | 7 | 16 |
| Enterobacter sp. | 2 | 4,7 |
| BGNNF | 1 | 2,3 |
| Neisseria sp. | 1 | 2,3 |
| Amostras sem crescimento | - | - |
| Total amostras com crescimento | 42 | 100 |

6.5.5 Estesiometria da córnea

A média da sensibilidade corneana central (sensibilidade limite ao toque da córnea) em 38 olhos de 19 carcarás, foi de $2,47 \pm 1,10$ cm. De acordo com a idade das aves o valor médio encontrado para adultos foram $2,13 \pm 0,87$ cm e para jovens $3,43 \pm 1,18$ cm. Houve diferença significativamente maior no valor da estesiometria das aves jovens em relação às adultas ($P= 0,002$). No entanto, não houve diferença significativa para estesiometria entre fêmeas e machos ($P=0,24$), nem entre olho direito e olho esquerdo ($P= 0,52$).

6.5.6 Pressão intra-ocular (PIO)

Em nosso estudo, a média da PIO encontrada nos 34 olhos dos 17 animais foi de $19,18 \pm 3,066$ mmHg. A PIO mensurada foi de $18,12 \pm 2,666$ mmHg para adultos e $22,5 \pm 1,41$ mmHg para jovens. Não houve diferença significativa entre a pressão intra-ocular para machos e fêmeas ($P= 0,22$) ou entre olho esquerdo ou direito ($P=0,83$). No entanto, a PIO das aves jovens foi significativamente maior em relação às adultas ($P= 0,001$).

6.5.7 Espessura central da córnea

O valor médio da espessura corneana central foi de $0,31 \pm 0,016$ mm para os carcarás machos e $0,31 \pm 0,017$ mm para os carcarás fêmeas. Não

houve diferença significativa na espessura corneana central entre machos e fêmeas ($P=0,95$) ou entre os olhos direito e os esquerdo ($P=0,91$).

6.5.8 Biometria ultrassonográfica de modo –B

O comprimento axial médio do bulbo ocular foi de $1,88 \pm 0,06$ cm para fêmeas e $1,91 \pm 0,06$ cm para machos; e $1,90 \pm 0,08$ cm de média para o olho direito e $1,89 \pm 0,04$ cm para o olho esquerdo. O valor médio da profundidade da câmara anterior (comprimento axial da câmara anterior) foi de $0,25 \pm 0,03$ cm para carcarás fêmeas e de $0,29 \pm 0,02$ cm para os machos. Avaliando o valor médio do comprimento axial da câmara anterior de ambos os olhos, o olho direito apresentou $0,27 \pm 0,04$ cm de média e $0,27 \pm 0,03$ cm para o olho esquerdo. A espessura média da lente (comprimento axial da lente) foi de $1,88 \pm 0,06$ cm para as fêmeas e de $1,91 \pm 0,06$ cm para os machos; e $0,45 \pm 0,03$ cm de média para o olho direito e $0,45 \pm 0,07$ cm para o olho esquerdo. A câmara vítrea apresentou profundidade (comprimento axial da câmara posterior) de $1,26 \pm 0,14$ cm para as aves fêmeas e de $1,14 \pm 0,04$ cm para as aves machos; $1,16 \pm 0,13$ cm para o olho direito e $1,1 \pm 0,10$ cm para o olho esquerdo. Não houve diferença significativa em quaisquer dos parâmetros avaliados ecobiometricamente entre machos e fêmeas ou entre olhos direitos e esquerdos ($P > 0,05$).

6.5.9 Diâmetro de Fenda Palpebral e Diâmetro de Córnea

O valor médio para o comprimento da fenda palpebral em 38 olhos de 19 aves foi de $13,32 \pm 1,06$ cm e o valor médio encontrado para o diâmetro corneano foi de $10,26 \pm 2,43$ cm. Em relação ao comprimento da fenda palpebral, os valores médios encontrados para machos foram $12,67 \pm 0,65$ cm e para fêmeas $13,32 \pm 0,83$ cm. Tendo as fêmeas uma pálpebra significativamente mais longa que os machos ($P= 0,04$). No entanto, não ocorreu diferença significativa entre jovens e adultos ($P=0,82$) ou entre olho direito e esquerdo ($P= 0,53$). Quanto ao diâmetro de córnea, os valores médios encontrados para os machos foram $11,06 \pm 0,44$ cm e para fêmeas $8,59 \pm 3,34$ cm, ocorrendo diferença significativamente maior dos machos em relação as fêmeas quando comparado o diâmetro corneano ($P=0,01$). No entanto, não houve diferença significativa entre olhos direito ou esquerdo ($P=0,89$) e nem entre adultos e jovens ($P=0,21$).

6.1 DISCUSSÃO

Na maioria das aves as fêmeas são visivelmente maiores que os machos ³ fato também observado no presente estudo em que as fêmeas apresentaram significativamente maiores que os machos.

O órgão sensorial da visão em aves é altamente especializado para adaptação às condições de vida, a sua acuidade visual é de 2 a 8 vezes maior do que a de mamíferos ⁶. A posição dos olhos no crânio varia conforme a

espécie de ave. Aves com crânio mais estreito, geralmente apresentam os olhos localizados lateralmente, enquanto aves com o crânio mais amplo tendem a ter os olhos localizados frontalmente.⁷ Observamos que o carcará, por ser um animal de crânio mais estreito, apresenta os olhos localizados mais lateralmente enquanto as corujas por apresentarem crânio mais amplo apresentam os olhos frontalmente⁷.

Foi demonstrado em um estudo⁸ que os pigmentos dominantes nos olhos das aves são as purinas e as pteridinas. No entanto, hoje, o que se conhece da complexidade da pigmentação da íris sabe-se que os melanóforos são os responsáveis pela cor castanho, enquanto que outras cores podem ser produzidas por estruturas como lípidos incolores, carotenóides, fibras de colágeno e por hemoglobina em seios venosos aumentados⁹. Combinações de purinas/pteridinas e carotenóides também são comuns. Em algumas espécies de columbiformes, a cor da íris também é influenciada pela presença de células refrativas (iridiócitos) que formam um tapete lúcido da íris e são responsáveis por rápidas mudanças de cor da mesma¹⁰. Observamos que a íris dos carcarás pode apresentar diferentes graus de pigmentação variando entre o castanho-escuro e castanho-claro, independente da idade e do sexo, isso corrobora outros autores que relatam que as cores da íris podem variar extraordinariamente entre indivíduos e espécies dependendo da quantidade de pigmentos, dos tipos de pigmentos e do grau de vascularização¹¹, e, que variam também com a idade, dieta¹² e sexo⁹.

O teste de lacrimal de Schirmer (TLS) é um componente importante do exame oftalmológico completo para avaliar a função da glândula lacrimal. Em

carcarás os valores médios para TLS foram $7,84 \pm 3,05$ mm/min. Semelhante aos encontrados em papagaios de barriga-vermelha (*Amazonas ventralis*) $7,9 \pm 2,6$ mm/min¹³. Entretanto, em um estudo feito com 255 aves de 42 espécies os valores de Schirmer observados para Psittaciformes foram de 3,2 a 7,5 mm/min, em falconiformes foram de 4,1 a 14,4 mm/min, sendo discretamente menores do que os valores encontrados em nossa pesquisa. Enquanto que em Accipitriformes 10,7 a 11,5 mm/min, os valores relatados foram um pouco maiores que os observados no presente estudo¹⁴.

O conhecimento da microbiota normal é um parâmetro muito importante para o conhecimento dos clínicos quando ocorrem doenças oculares externa. A superfície do olho é rica em nutrientes e, conseqüentemente, muitos microrganismos podem ser encontrados, constituindo a denominada microbiota normal ocular¹⁵. A população bacteriana conjuntival normal tem sido estudada em diferentes espécies animais, como porcos¹⁶, cães^{17; 18}, gatos¹⁹, cavalos²⁰, bois²¹, carneiros²², coelhos²³, aves²⁴, veados²⁵ castores²⁶ furão-europeu²⁷ macaco-prego²⁷ entre outras espécies. Estes dados auxiliam na melhor conduta de possíveis tratamentos quando processos infecciosos estão presentes.

O presente estudo revelou que a microbiota da superfície ocular saudável de carcará alberga, de forma significativa, as bactérias do tipo Gram-positivas. Esse dado concorda com diversos trabalhos da microbiota ocular em animais como no cão^{17; 18}, gato¹⁹ cavalo²⁰, guaxinim²⁹, gambá²⁹, coelhos²³, aves²⁴, castor²⁶, furão europeu²⁷, macaco-prego²⁷ e capivaras³⁰ nos quais os isolados Gram-positivos foram os mais abundantes.

Os gêneros que foram significativamente mais expressivos foram *Staphylococcus* sp. *Streptococcus* sp e *Corynebacterium* sp. Esses também aparecem como os mais isolados em diferentes espécies animais, como gatos^{19; 31}; camelos³², quatis³³ e mão-pelada³³.

Dentre as bactérias Gram-negativas, as mais isoladas foram as bactérias da família Enterobacteriaceae. A espécie que mais teve destaque neste estudo foi *Escherichia coli*. O isolamento de *E. coli* em olhos de animais é um achado relativamente comum e já foi descrito em olhos sadios de cães^{18 34}, cavalos²⁰, gatos³¹, guaxinins²⁹ e camelos³². Por ser uma bactéria habitante natural do intestino de mamíferos, ela é excretada pelas fezes, podendo sobreviver em partículas fecais, poeira e água por meses³⁵. O seu isolamento neste trabalho pode indicar possível contaminação fecal, sendo neste caso, apenas uma bactéria transitória da conjuntiva. Estudos sequenciais com novas coletas advindas do mesmo animal, em diferentes dias, poderiam esclarecer o papel desta bactéria como possível membro transitório ou não da microbiota ocular. Outra bactéria isolada desta família foi, *Enterobacter* sp, que também já foi descrita em olhos de animais sadios, primatas não-humanos³⁶, cães¹⁸, quatis³³ e mão-pelada³³, numa proporção baixa, como na presente investigação. Assim como no caso das *E.coli*, estas bactérias não parecem serem residentes do olho e sim, agentes transitórios que por ventura foram encontrados.

Na medicina veterinária o estesiômetro de *Cochet-Bonnet*, é uma ferramenta bem estabelecida para a determinação da sensibilidade da córnea, por meio da avaliação da sensibilidade ao toque ou limite da sensibilidade^{37, 38}.

Em comparação à avaliação estesiométrica do porquinho-da-índia 2,0 cm³⁹, chinchila 1,24⁴⁰ e cavalos 2,2 cm⁴¹, nosso trabalho demonstrou semelhança. Mas comparando as idades, em nosso estudo, os jovens demonstraram valores significativamente maiores que os adultos quanto a sensibilidade corneana, fato também observado em cavalos⁴¹, gatos⁴² e seres humanos^{43;44}

A avaliação da PIO em carcarás apresentou valor médio de 19,182± 3,066 mmHg, sendo esse valor um pouco maior que os observados em corujas (*Bubo bubo*) (9,35 ±1,81mmHg)⁴⁵, Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) 11,4 ± 2,7 mmHg⁴⁶ e Peneireiros comuns (*Falco tinnunculus*) 13,9 ± 3,5 mmHg⁴⁶. Em comparação com a PIO de outras espécies, o carcará apresentou valores semelhantes aos encontrados em aves de rapina de diferentes espécies 10,8 – 21,5mmHg⁴⁷, macacos-prego (*Cebus apela*) 18,4± 3,8 mmHg²⁸ e capivara 18.4 ± 3.8 mmHg³⁰. Também foi observado que a pressão intra-ocular dos carcarás jovens era significativamente maior do que em os adultos, sendo essa diferença observada, inversamente da relatada em um estudo realizado em gaviões falcões e urubus onde a média da pressão ocular em aves jovens foi significativamente menor do que em aves adultas⁴⁸. Entretanto essa diferença de idade não foi relatada como significativa em um estudo feito entre Peneireiros das torres (*Falco naumanni*) 11,4 ± 2,7 mmHg e Peneireiros comuns (*Falco tinnunculus*) 13,9 ± 3,5 mmHg⁴⁶. Portanto novos estudos com tonometria comparando idades com tonometria devem ser considerados.

A mensuração da espessura central da córnea realizada em carcarás pelo paquímetro ultrassônico foi de 0,29 ± 0,03 mm. Comparado a outras

espécies apresentou valores semelhantes aos observados em furão- europeu $0,33 \pm 0,02 \text{ mm}^{27}$, chinchilas $0,34 \pm 0,03 \text{ mm}^{40}$ e coelhos $0,38 \pm 0,02 \text{ mm}^{49}$ e valores menores dos que os observados em capivaras $0,46 \pm 0,03 \text{ mm}^{30}$, ovinos $0,66 \pm 0,82 \text{ mm}^{50}$ e seres humanos $0,46 \pm 0,04 \text{ mm}^{51}$.

Em relação à ultrassonografia, o comprimento axial do bulbo ocular, apresentou-se relativamente menor que os observados em capivaras $22,20 \pm 1,71 \text{ mm}^{30}$ e corujas $23,76 \pm 0,92 \text{ mm}^{52}$, maior que os observados em chinchilas $11,42 \pm 0,64 \text{ mm}^{40}$ e semelhante ao relatado em coelhos $17,12 \text{ mm} \pm 0,41^{53}$. O comprimento axial da câmara anterior apresentou valor menor que o encontrado em capivaras $4,60 \pm 1,35 \text{ mm}^{30}$ e corujas $4,27 \pm 0,47 \text{ mm}^{52}$, discretamente maior do que o observado em chinchilas $2,01 \pm 0,2 \text{ mm}^{40}$ e semelhante ao que foi relatado em coelhos $2,70 \text{ mm} \pm 0,22 \text{ mm}^{53}$. Quando comparado ao da capivara $7,41 \pm 0,7 \text{ mm}^{30}$, corujas = $7,79 \pm 0,27 \text{ mm}^{52}$, chinchila $5,49 \pm 0,43 \text{ mm}^{40}$ e coelho $7,32 \text{ mm} \pm 0,40 \text{ mm}^{53}$ o comprimento axial da lente do carcarás é relativamente menor. Em relação ao comprimento axial da câmara posterior, o valor é relativamente maior $10,13 \pm 0,88 \text{ mm}$ do que o observado em capivaras 30 , chinchilas $3,69 \pm 0,52 \text{ mm}^{40}$ e coelhos $7,10 \text{ mm} \pm 0,45 \text{ mm}^{53}$ e semelhante ao observado em corujas $11,36 \pm 0,29 \text{ mm}^{52}$.

No presente estudo, o diâmetro palpebral apresentado foi maior do que o relatado em chinchilas $1,44 \pm 0,11 \text{ mm}^{40}$.

O fato das fêmeas possuírem comprimentos das fissuras palpebrais maiores em relação aos machos pode possivelmente ser explicado pelo tamanho visivelmente maior das mesmas nesta espécie e em muitas outras

espécies de aves de rapina ³. Contudo em relação ao diâmetro corneano, os machos apresentaram valores significativamente maiores em relação as fêmeas, sendo essa diferença não relatada em chinchilas e nem em seres humanos. Estudos comparativos em diâmetro de pálpebra e diâmetro corneano em aves de rapina e em outros animais ainda são escassos na área de oftalmologia veterinária, sendo assim necessários novos estudos.

Para melhor compreensão de algumas das características morfológicas descritas sobre o olho de carcará neste trabalho, acredita-se ser necessário o desenvolvimento estudos complementares sobre órbita, histologia ocular e fundoscopia. Este estudo poderá ser uma das linhas de pesquisa para o desenvolvimento de um trabalho futuro. No entanto, as os valores de referência e características morfológicas obtidos para os testes oftálmicos nesta pesquisa, poderão ajudar outros de médicos veterinários oftalmologistas no reconhecimento de características morfológicas peculiares dessa ave, assim como, um diagnóstico mais preciso das oftalmopatias e na percepção de alterações patológicas discretas contribuindo assim para a otimização do atendimento oftalmológico fornecido a estes animais.

6.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.Sick, H. *Ornitologia Brasileira, Uma Introdução*. 3^a ed. Editora Universidade de Brasília, Brasília. 1988; 827.
- 2.Sick, H. *Ornitologia Brasileira*. 4^a ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 2001; 862.
- 3.Weidensaul, S. *Raptors- The birds of prey: an almanac of hawks, eagles, and falcons of the world*. Swan Hill Press,Shrewsbury 1996;382.

4. Antas, P.T.Z. Aves do Pantanal. RPPN. Sesc: 2005.
5. Sick, H. Ornitologia Brasileira. 2^a ed. Nova Fronteira Rio de Janeiro. 1997; 265.
6. Bennett A T, Cuthill IC. Ultraviolet vision in Birds: What is its Function? *Vision Research*. 1994; 34 (11): 1471-1478.
7. Orosz SE. The special senses of birds. In: B.H. Coles (Ed.), *Essentials of avian medicine and surgery* (3rd Ed.) Oxford, UK: Blackwell Publishing. 2007; 22-39.
8. Oliphant LW. Pteridines and purines as major pigments of the avian iris. *Pigment Cell Research*. 1987; 1(2):129-131.
9. Bortolotti GR, Smits JE, Bird DM. Iris colour of american kestrels varies with age, sex and exposure to PCBs. *Physiological and Biochemical Zoology*. 2003; 76(1): 99-104.
10. Jones MP, Pierce KE, Ward D. Avian vision: a review of form and function with special consideration to birds of prey. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2007; 16(2): 69-87.
11. Samuelson D. Ophthalmic anatomy. In K.N. Gelatt (Ed.), *Veterinary ophthalmology* (3rd Ed). Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins. 1999; 31-150
12. Gum G, Gelatt KN. (Ed.) & Ofri, R. Physiology of the eye. In K.N. Gelatt (Ed.), *Veterinary ophthalmology* (3rd Ed.) Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins. 1999; 151-182.
13. Storey ES, Carboni DA, Kearney MT, *et al.* Use of phenol red thread tests to evaluate tear production in clinically normal Amazon parrots and comparison with Schirmer tear test findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2009; 235 (10): 1181- 1187.
14. Korbel R, Leitenstorfer P. The modified Schirmer tear test in birds- A method for checking lacrimal gland function. *Tierärztliche Praxis*. Ausgabe K, Kleintiere Heimtiere. 1998; 26 (4): 284-294.
15. Slatter D. Fundamentals of veterinary ophthalmology. 3a ed. Philadelphia: W. B. Saunders. 2001; 640.
16. Davidson HJ, Rogers DP, Yeary TJ *et al.* Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. *American Journal of Veterinary Research*. 1994; 55(7): 949–951.

17. Moore CP, Nasisse MP. Clinical microbiology. In: Gellat, K.N. Vet Ophthalmol. 3aed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. 1999; 259–289.
18. Wang L, Pan Q, Zhang QX, *et al.* Investigation of bacteria microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. *Veterinary Ophthalmology*. 2008; 11(3): 145-149.
19. Shewen PE, Povey RC, Wilson MR. A Survey of the Conjunctival Flora of Clinically Normal Cats and Cats with Conjunctivitis. *Canadian Veterinary Journal*. 1980; 21(8): 231–233.
20. Andrew SE, Nguyen A, Jones GL, *et al.* Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Veterinary Ophthalmology*. 2003; 6: 45–50.
21. Davidson HJ, Vestweber JG, Brightman AH, *et al.* Ophthalmic examination and conjunctival bacteriologic culture results from a herd of North American bison. *Journal of the American Medical Association*. 1999; 215 (8): 1142–1144.
22. Almeida neto JB, SÁ FB, SILVA KPC, *et al.* Flora conjuntival bacteriana de ovinos sadios da raça Sta Inês e seus mestiços criados na microrregião de Garanhuns, PE. *Ciência Veterinária Tropical*. 2006; 9 (1): 17 – 22.
23. Cooper SC, Mclellan GJ, Rycroft AN. Conjunctival flora observed in 70 healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Record*. 2001; 149 (8): 232–235.
24. Silvanose CD, Bailey TA, Naldo JL. Bacterial flora of the conjunctiva and nasal cavity in normal and diseased captive bustards. *Avian Diseases*. 2001; 45(2): 447–451.
25. Dubay SA, Williams ES, Mills K, *et al.* Bacteria and nematodes in the conjunctiva of mule deer from Wyoming and Utah. *Journal of Wildlife Diseases*. 2000; 36 (4): 783–787.
26. Cullen CL. Normal ocular features, conjunctival microflora and intraocular pressure in the Canadian beaver (*Castor canadensis*). *Veterinary Ophthalmology*. 2003; 6: 279–284.

27. Montiani-Ferreira F, Mattos BC, Russ HH. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Ophthalmology*. 2006; 9(4): 209-213.
28. Montiani-Ferreira F, Shaw G, Mattos BC, *et al*. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*). *Veterinary Ophthalmology*. 2008;11(3): 197-201.
29. Pinard CL, Brightman AH, Yeary TJ, *et al*. Normal conjunctival flora in the North American opossum (*Didelphis virginiana*) and raccoon (*Procyon lotor*). *Journal of Wildlife Diseases*. 2002; 38(4): 851-855.
30. Montiani-Ferreira F, Truppel J, Tramontin MH, *et al*. The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. *Veterinary Ophthalmology*. 2008a; 11(3): 386-394.
31. Souza JOT, Angelo FF, Homem LAS. Microbiota bacteriana conjuntival de felinos domésticos (*Felis catus*, Linnaeus, 1785) sadios da cidade de Juiz de Fora. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 2010; 15: ano III.
32. Fahmy LS, Hegazy AA, Abdelhamid MA, *et al*. Studies on eye affections among camels in Egypt: clinical and bacteriological studies. *Scientific Journal of King Faisal University*. 2003; 4(2): 159-176.
33. Spinelli TP, Oliveira-Filho EF, SILVA D, *et al*. Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in Pernambuco and Paraíba (Northeast, Brazil). *Veterinary Ophthalmology*. 2010; 13: (Supplement 1), 134-136.
34. Prado MR, Rocha MFG, BRITO EHS, *et al*. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceara, Brazil. *Veterinary Ophthalmology*. 2005; 8 (1): 33-37.
35. Quinn PJ, CARTER ME, MARKEY B, *et al*. Staphylococcus species. In: *Ibid.*(Eds), *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe, London. 1994; 118-125.
36. Galera PD, Avila MO, Ribeiro CR, *et al*. Estudo da microbiota da conjuntiva ocular de macacos-prego (*Cebus apella*) e macacos bugio

- (*Alouatta caraya*) provenientes do reservatório de manso, MT, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2002; 69 (2): 33-36.
37. Chan-Ling T. Sensitivity and neural organization of the cat cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1989; 30 (6): 1075–1082.
 38. Barrett PM, Scagliotti RH, Merideth RE et al. Absolute corneal sensitivity and corneal trigeminal nerve anatomy in normal dogs. *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology*. 1991; 1: 245–254.
 39. Trost K, Skalichy M, Nell B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Veterinary Ophthalmology* 2007; 10(3): 143-146.
 40. Lima L, Montiani-Ferreira F, Tramontin M, et al. The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. *Veterinary Ophthalmology*. 2010; 13 (1):14-25.
 41. Kaps S, Richter M, Spiess BM. Corneal esthesiometry in the healthy horse. *Veterinary Ophthalmology*. 2003; 6: 151–155.
 42. Blocker T, Van Der Woerd A. A comparison of corneal sensitivity between brachycephalic and Domestic Short-haired cats. *Veterinary Ophthalmology*. 2001; 4(2): 127-130.
 43. Boberg-Ans J. Experience in clinical examination of corneal sensitivity. *British Journal of Ophthalmology*. 1955; 39 (12): 705–726.
 44. Millodot M. The influence of age on the sensitivity of the cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1977; 16 (3): 240–242.
 45. Jeong MB, Kim YJ, Yi NY, et al. Comparison of the rebound tonometer (TonoVet®) with the applanation tonometer (TonoPen XL®) in normal Eurasian Eagleowls (*Bubo bubo*). *Veterinary Ophthalmology*. 2007; 10(6): 376-379.
 46. Pisa ARC. Tonometria em Aves de Rapina – Aspectos da sua Aplicação na Prática Clínica. Dissertação, Universidade Técnica de Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária, 2011.
 47. Stiles J, Buyukmihci NC, Farver TB. Tonometry of normal eyes in raptors. *American Journal of Veterinary Research*. 1994; 55(4): 477-499.

48. Reuter A, Müller K, Arndt G, *et al.* Reference intervals for intraocular pressure measured by rebound tonometry in ten raptor species and factors affecting the intraocular pressure. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2011; 25(3): 165-172.
49. Sailstad DM, Peiffer RL Jr. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Laboratory Animals*. 1981;15(4):393-395.
50. Brandão CVS, Ranzani JJT, Rodrigues GN, *et al.* Mensuração da espessura corneana em ovinos com paquimetria ultra-sônica e microscopia especular de não contato (*Corneal thickness measurements in ovines with ultrasonic pachymetry and noncontact specular microscopy*). *Archives of Veterinary Science*. 2006; 11(2): 10-12.
51. Kawana K, Tokunaga T, Miyata K *et al.* Comparison of corneal thickness measurements using Orbscan II, non-contact specular microscopy, and ultrasonic pachymetry in eyes after laser in situ keratomileusis. *British Journal of Ophthalmology* . 2004; 88(4): 466–468.
52. Squarzon R, Perlmann E, Antunes A, *et al.* Ultrasonographic aspects and biometry of Striped owl's eyes (*Rhinoptynx clamator*). *Veterinary Ophthalmology*. 2010; 13(1): 86–90.
53. Toni MC, Meirelles AEWB, Gava FN, *et al.* Rabbits' eye globe sonographic biometry. *Veterinary Ophthalmology*. 2010; 13(6): 384–386.

ANEXO 1

1. Certificado do comitê de Ética no uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, UFPR, 2010.



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 024/2010, referente ao projeto “Soro prevalência de *Encephalitozoon cuniculi* em coelhos domésticos do estado do Paraná e São Paulo”, sob a responsabilidade de Suelen Berger Baldotto em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 23 de Agosto de 2010. Este certificado expira em 23 de agosto de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 024/2010, regarding the project “Soroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the State of Paraná and São Paulo”, in charge of Suelen Berger Baldotto, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on August 2010. This certificate expires on August, 2011.

Curitiba, 23 de agosto de 2010.


Geraldo Camilo Alberton
Presidente


Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

VITA

Suelen Berger Baldotto, Médica Veterinária formada pela Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE. Especialista em Clínica e Cirurgia de pequenos animais pela Universidade do Oeste Paulista. Também com Especialização em Treinamento em Serviço em Medicina Veterinária com ênfase em Clínica de pequenos animais e em Oftalmologia. Mestrado em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Curitiba.

Durante o mestrado, cooperou com projetos de pesquisa dos alunos da Pós-Graduação da UFPR, Prof. Rogério Ribas Lange (doutorando), Ana Carolina da Veiga Rodarte Almeida (doutoranda), Sávila Calline C. Santos Paiva (mestrado concluído), Lucianne Leigue dos Santos (mestrado concluído) e Raquel de Araújo Cantarella (mestranda). Todos orientados pelo Prof. Dr Fabiano Montiani Ferreira.

Participou do Grupo de Oftalmologia Comparada e do Grupo de Estudos em Patologia Ocular da UFPR. Foi membro fundadora e 1ª secretária do Grupo de Pesquisa Simon Petersen-Jones: Estudos em Oftalmologia Comparada da UFPR (Curitiba/PR) no ano de 2009.

A dissertação proporcionou um estudo que gerou material científico, além da parceria da UFPR com a Universidade de Miami na Flórida (Escola de Medicina, Laboratório de Patologia Comparada). Todo material científico que foi gerado com a dissertação, por sua vez, resultará no desenvolvimento de artigos, com pretensão de envio para a revista internacional *Veterinary Ophthalmology* e *Veterinary Parasitology* no ano de 2012.